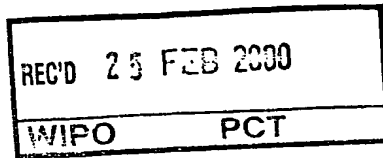


BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND

4

09/839700

EPO - Munich  
63

04. Feb. 2000

EP99/10460

**Bescheinigung**

Herr Professor Dr. Albrecht E. S i p p e l in Freiburg, Breisgau/Deutschland hat  
eine Patentanmeldung unter der Bezeichnung

"Methode zur zellulären High-Throughput-Detektionen von  
Rezeptor-Liganden-Interaktionen"

am 30. Dezember 1998 beim Deutschen Patent- und Markenamt eingereicht.

Die angehefteten Stücke sind eine richtige und genaue Wiedergabe der ursprüng-  
lichen Unterlagen dieser Patentanmeldung.

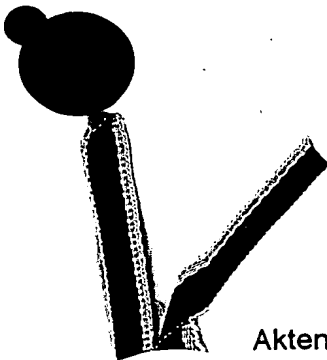
Die Anmeldung hat im Deutschen Patent- und Markenamt vorläufig das Symbol  
C 12 N 1/00 der Internationalen Patentklassifikation erhalten.

München, den 20. Januar 2000

Deutsches Patent- und Markenamt

Der Präsident

Im Auftrag



Aktenzeichen: 198 60 833.0

**PRIORITY  
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

Weihmayr

Prof. Dr. Sippel

1A-81 717

### PATENTANSPRÜCHE

1. Zelle, umfassend einen zellulären Membranrezeptor, der einen Ligandenbindungsabschnitt, ein Membranlokalisierungssignal und einen Mediatorabschnitt umfaßt, dadurch gekennzeichnet, daß nur bei Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt eine Strukturänderung mit Auswirkungen auf den Mediatorabschnitt bewirkt wird, so daß in der Folge ein Effektorprotein oder -polypeptid, das in der Lage ist, einen Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg in der Zelle zu aktivieren, an eine Komponente der Membran, gegebenenfalls über weitere Proteine oder Polypeptide (Adaptoren), bindet.

2. Zelle nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Effektorprotein oder -polypeptid, das in der Lage ist, einen Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg zu aktivieren, ein Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF) oder ein aktives Protein aus der Ras-Familie ist.

3. Zelle nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Effektorprotein oder -polypeptid, das in der Lage ist, einen Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg zu aktivieren, das CDC25-Protein aus *Saccharomyces cerevisiae* oder ein SOS-Protein aus einem Säugtier oder ein SOS-ähnliches Protein aus einem beliebigen Organismus ist oder von einem solchen Protein abgeleitet ist.

4. Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß das Effektorprotein oder -polypeptid, das in der Lage ist, einen Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg zu aktivieren, in Form eines Fusionsproteins eines Effektorabschnitts mit einem Adaptorprotein oder -polypeptid vorliegt, das die Bindung an die Komponente der Membran, gegebenenfalls über weitere Proteine oder Polypeptide (Adaptoren), ermöglicht.

5. Zelle nach Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein einer enzymatischen Modifizierung bedarf, bevor es an die Komponente der Membran, gegebenenfalls über weitere Proteine oder Polypeptide (Adaptoren), gebunden werden kann und daß eine für die enzymatische Modifizierung erforderliche enzymatische Aktivität nur aufgrund einer Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt aktiviert wird.

6. Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Membranrezeptor ein Transmembranrezeptor, ein Enzym-gekoppelter Rezeptor, ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, ein 7-Transmembranrezeptor oder ein Geruchsrezeptor ("Odour Receptor" oder "Olfactorial Receptor") ist.

7. Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, daß der Membranrezeptor ein in der Natur nicht vorkommender, synthetischer Membranrezeptor ist.

8. Zelle nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligandenbindungsabschnitt von einem Ligandenbindungsabschnitt eines in der Natur vorkommenden Rezeptors abgeleitet ist.

9. Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligandenbindungsabschnitt den Ligandenbindungsabschnitt eines Transmembranrezeptors, eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors, eines 7-Transmembranrezeptors, eines Geruchsrezeptors ("Odour Receptor" oder "Olfactorial Receptor") oder eines nukleären Rezeptors umfaßt oder von diesem abstammt.

10. Zelle nach Anspruch 7, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligandenbindungsabschnitt von einem Ligandenbindungsabschnitt eines in der Natur vorkommenden Rezeptors, und insbesondere von dem Ligandenbindungsabschnitt eines Transmembranrezeptors, eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors, eines 7-Transmembranrezeptors, eines Geruchsrezeptors ("Odour Receptor" oder "Olfactorial Receptor") oder eines nukleären Rezeptors, durch Mutation, insbe-

sondere durch Substitution, Deletion, Insertion und/oder Modifizierung einer oder mehrerer Aminosäuren oder Gruppen von Aminosäuren, abgeleitet oder ein durch "molecular modelling" erzeugter, synthetischer Ligandenbindungsabschnitt ist.

11. Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Mediatorabschnitt den zytoplasmatischen Teil eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors, Abschnitte davon oder eine davon abgeleitete Aminosäurefolge umfaßt.

12. Zelle nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß das Effektorprotein oder -polypeptid, das in der Lage ist, einen Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg in der Zelle zu aktivieren, in Form eines Fusionsproteins eines Effektorabschnitts mit einem Adaptorprotein vorliegt, das nach Abdissoziation der  $\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins mit den aufgrunddessen frei zugänglichen Bereichen der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten des G-Proteins, die in Assoziation mit dem Mediatorabschnitt vorliegen, oder mit der  $\alpha$ -Untereinheit des heterotrimeren G-Proteins nach Abdissoziation von der  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheit des G-Proteins oder infolge der Dissoziation des heterotrimeren G-Proteins mit dem Mediatorabschnitt des Membranrezeptors wechselwirken kann.

13. Zelle nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein einen Effektorabschnitt und eine GRK2-Kinase oder eine GRK3-Kinase umfaßt.

14. Zelle nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein einen Effektorabschnitt und einen Antikörper, der spezifisch die  $\beta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten des G-Proteins nach Abdissoziation der  $\alpha$ -Untereinheit erkennt und bindet, umfaßt.

15. Zelle nach einem der Ansprüche 12 bis 14, dadurch gekennzeichnet, daß der Effektorabschnitt des Fusionsproteins die Sequenz eines aktiven Ras-Proteins umfaßt.

16. Zelle nach Anspruch 11, dadurch gekennzeichnet, daß der Mediatorabschnitt den zytoplasmatischen Teil eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors, Abschnitte davon oder eine davon abgeleitete Aminosäurefolge umfaßt, wobei das mit dem zytoplasmatischen Teil des G-Protein-gekoppelten Rezeptors wechselwirkende G-Protein in aktiviertem Zustand eine Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) aktiviert.

17. Zelle nach Anspruch 16, dadurch gekennzeichnet, daß das Effektorprotein oder -polypeptid, das in der Lage ist, einen Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg in der Zelle zu aktivieren, in Form eines Fusionsproteins eines Effektorabschnitts mit einer "Src homology 2" (SH2)- oder einer "pleckstrin homology" (PH)-Domäne vorliegt.

18. Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, daß der Mediatorabschnitt infolge der Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt in der Lage ist, ein oder mehrere Adaptorproteine zu binden, über welche das Effektorprotein oder -polypeptid, das in der Lage ist, einen Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg in der Zelle zu aktivieren, an den Mediatorabschnitt binden kann.

19. Zelle nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Mediatorabschnitt infolge einer Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt in die Lage versetzt wird, eine enzymatische Aktivität auszuüben.

20. Zelle nach Anspruch 19, dadurch gekennzeichnet, daß der Mediatorabschnitt infolge einer Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt in die Lage versetzt wird, eine Tyrosinkinaseaktivität, eine Serin/Threoninkinase- oder Phosphataseaktivität auszuüben.

21. Zelle nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß der Mediatorabschnitt den cytoplasmatischen Teil des EGFR ("epidermal growth factor receptor") umfaßt oder von diesem abstammt.

22. Zelle nach Anspruch 18, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligandenbindungsabschnitt infolge einer Bindung eines Liganden für diesen Ligandenbindungsabschnitt in die Lage versetzt wird, ein separates, rezeptorspezifisches Enzym zu aktivieren.
23. Zelle nach Anspruch 22, dadurch gekennzeichnet, daß das separate, rezeptorspezifische Enzym heterolog zu der Zelle ist.
24. Zelle nach Anspruch 22 oder 23, dadurch gekennzeichnet, daß das separate rezeptorspezifische Enzym eine Kinase und insbesondere eine Tyrosinkinase ist.
25. Zelle nach einem der Ansprüche 18 bis 24, dadurch gekennzeichnet, daß von dem Mediatorabschnitt infolge der Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt die Adaptorproteine Gbr2 oder Shc gebunden werden können.
26. Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 25, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine prokaryotische oder eukaryotische Zelle ist.
27. Zelle nach Anspruch 26, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle eine eukaryotische Zelle und insbesondere eine Hefezelle, speziell eine zellwandlose Hefezelle ist.
28. Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 27, dadurch gekennzeichnet, daß sie auf einem festen Träger aufgebracht ist.
29. Zelle nach Anspruch 28, dadurch gekennzeichnet, daß die Zelle auf Biochips immobilisiert oder in Mikrokammern eingeschlossen ist.
30. Zelle nach einem der Ansprüche 1 bis 29, dadurch gekennzeichnet, daß bei Fehlen des Membranrezeptors zumindest unter bestimmten Bedingungen ein Ras- oder Ras-ähnlicher Signalweg in der Zelle nicht aktiviert werden kann.

31. Zelle nach Anspruch 30, dadurch gekennzeichnet, daß die Aktivierbarkeit des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs bei Fehlen des Membranrezeptors temperaturabhängig ist.

32. Zelle nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß die fehlende Aktivierbarkeit des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs bei Fehlen des Membranrezeptors oberhalb einer bestimmten Temperatur auf zumindest einer Mutation eines zelleigenen Guanine Nucleotide Exchange Factors beruht, welche bewirkt, daß dieser oberhalb der bestimmten Temperatur funktionsunfähig wird.

33. Zelle nach Anspruch 32, dadurch gekennzeichnet, daß die Zellen Zellen des *Saccharomyces cerevisiae*-Hefestamms cdc25-2 sind oder davon abgeleitet sind.

34. Zelle nach Anspruch 31 oder 32, dadurch gekennzeichnet, daß die fehlende Aktivierbarkeit des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs bei Fehlen des Membranrezeptors oberhalb einer bestimmten Temperatur auf zumindest einer Mutation eines zelleigenen Ras-Proteins beruht, welche bewirkt, daß dieses oberhalb der bestimmten Temperatur funktionsunfähig wird.

35. *in vivo*-Assay zur Bestimmung der Eignung einer Testsubstanz als Ligand für einen Ligandenbindungsabschnitt eines Rezeptors, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

(a) Inkontaktbringen der Testsubstanz mit Zellen nach einem der Ansprüche 30 - 34 unter Bedingungen, bei denen bei Fehlen des Membranrezeptors der Ras- oder Ras-ähnliche Signalweg in der Zelle nicht aktiviert werden kann, wobei der Membranrezeptor den genannten Ligandenbindungsabschnitt enthält und das Effektorprotein oder -polypeptid, dessen Bindung an eine Membrankomponente von der Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors, wie in Anspruch 1 definiert, abhängig ist, in der Lage ist, diesen Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg zu aktivieren,

(b) Untersuchen, ob eine Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs erfolgt ist, wobei ein Nachweis der Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs die Bindungsfähigkeit der Testsubstanz an den Ligandenbindungsabschnitt anzeigt.

36. Assay nach Anspruch 35, wobei Schritt (b) umfaßt, die Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs über die gegebenenfalls erfolgende Expression eines Reportergens, die nur aufgrund der infolge der Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs erfolgenden Aktivierung eines spezifischen Transkriptionsfaktors erfolgt, nachzuweisen, wobei der Nachweis der Expression des Reportergens die Bindungsfähigkeit der Testsubstanz an den Ligandenbindungsabschnitt anzeigt.

37. Assay nach Anspruch 35, wobei in Schritt (a) Zellen, bei denen der inaktive bzw. inaktivierbare Ras- oder Ras-ähnliche Signalweg ein Signalweg ist, der auf den Zellzyklus einwirkt und dessen Aktivierung für die Zellvermehrung essenziell ist, eingesetzt werden und Schritt (b) umfaßt, zu untersuchen, ob die Zellen unter den genannten Bedingungen vermehrungsfähig sind, wobei ein Nachweis der Vermehrungsfähigkeit der Zellen die Bindungsfähigkeit der Testsubstanz an den Ligandenbindungsabschnitt anzeigt.

38. Assay nach einem der Ansprüche 35 bis 37, dadurch gekennzeichnet, daß die Testsubstanz eine natürlich vorkommende Substanz und insbesondere ein Geruchsstoff, Geschmacksstoff, Peptid, Peptidhormon, Protein, insbesondere Zytokin, Wachstumsfaktor, Neurotransmitter, nicht-protein- oder -peptidartiges Hormon und/oder ein Vitamin ist.

39. Assay nach einem der Ansprüche 35 bis 37, dadurch gekennzeichnet, daß die Testsubstanz eine in der Natur nicht vorkommende Substanz und insbesondere ein synthetisches Derivat eines natürlichen Liganden oder ein Giftstoff, insbesondere Dioxin, ist.



40. Assay nach Anspruch 39, dadurch gekennzeichnet, daß die Testsubstanz als Fusionsprotein, umfassend eine mutmaßliche Ligandendomäne, eingesetzt wird.

41. Screeningverfahren nach unbekannten Liganden eines bestimmten Rezeptors, dadurch gekennzeichnet, daß für das Screening ein Assayverfahren nach einem der Ansprüche 35 bis 37 eingesetzt wird.

42. *in vivo*-Assay zum Nachweis der Anwesenheit eines Liganden für einen Ligandenbindungsabschnitt eines Rezeptors in einer Probe, die diesen möglicherweise enthält, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

(a) Inkontaktbringen der Probe mit Zellen nach einem der Ansprüche 30 - 34 unter Bedingungen, bei denen bei Fehlen des Membranrezeptors der Ras- oder Ras-ähnliche Signalweg in der Zelle nicht aktiviert werden kann, wobei der Membranrezeptor den genannten Ligandenbindungsabschnitt enthält und das Effektorprotein oder -polypeptid, dessen Bindung an eine Membrankomponente von der Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors, wie in Anspruch 1 definiert, abhängig ist, in der Lage ist, diesen Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg zu aktivieren,

(b) Untersuchen, ob eine Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs erfolgt ist, wobei ein Nachweis der Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs die Anwesenheit eines Liganden für den Ligandenbindungsabschnitt eines Rezeptors in der Probe anzeigt.

43. Assay nach Anspruch 42, wobei Schritt (b) umfaßt, die Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs über die gegebenenfalls erfolgende Expression eines Reportergens, die nur aufgrund der infolge der Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs erfolgenden Aktivierung eines spezifischen Transkriptionsfaktors erfolgt, nachzuweisen, wobei der Nachweis der Ex-

pression des Reportergens die Anwesenheit eines Liganden für den Ligandenbindungsabschnitt eines Rezeptors in der Probe anzeigt.

44. Assay nach Anspruch 42, wobei in Schritt (a) Zellen, bei denen der inaktive bzw. inaktivierbare Ras- oder Ras-ähnliche Signalweg ein Signalweg ist, der auf den Zellzyklus einwirkt und dessen Aktivierung für die Zellvermehrung essenziell ist, eingesetzt werden und Schritt (b) umfaßt, zu untersuchen, ob die Zellen unter den genannten Bedingungen vermehrungsfähig sind, wobei ein Nachweis der Vermehrungsfähigkeit der Zellen die Anwesenheit eines Liganden für den Ligandenbindungsabschnitt eines Rezeptors in der Probe anzeigt.

45. Screeningverfahren nach unbekannten Liganden eines bestimmten Rezeptors in einer Probe, dadurch gekennzeichnet, daß für das Screening ein Assayverfahren nach einem der Ansprüche 42 bis 44 eingesetzt wird.

46. *in vivo*-Assay zur quantitativen Bestimmung der Konzentration eines Liganden für einen Ligandenbindungsabschnitt eines Rezeptors in einer Probe, die diesen enthält, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

(a) Inkontaktbringen eines Aliquots der Probe mit Zellen nach einem der Ansprüche 30 bis 34 unter Bedingungen, bei denen bei Fehlen des Membranrezeptors der Ras- oder Ras-ähnliche Signalweg in der Zelle nicht aktiviert werden kann, wobei der Membranrezeptor den genannten Ligandenbindungsabschnitt enthält und das Effektorprotein oder -polypeptid, dessen Bindung an eine Membrankomponente von der Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors, wie in Anspruch 1 definiert, abhängig ist, in der Lage ist, diesen Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg zu aktivieren,

(b) quantitatives Nachweisen des Ausmaßes der Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweges auf direktem oder indirektem Weg,

(c) Ermittlung der Konzentration des Liganden in der Probe durch Vergleich des ermittelten Aktivierungsausmaßes mit entsprechen-

den Werten, die für bekannte Standardkonzentrationen des Liganden ermittelt wurden.

47. Assay nach Anspruch 46, dadurch gekennzeichnet, daß der quantitative Nachweis des Ausmaßes der Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweges in Schritt (b) indirekt erfolgt, indem die in den Zellen vorliegende Menge eines Transkriptions- oder Translationsprodukts eines Reportergens, dessen Expression nur aufgrund der infolge der Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweges erfolgenden Aktivierung eines spezifischen Transkriptionsfaktors erfolgt, zu einem bestimmten Zeitpunkt oder die Expressionsrate dieses Reportergens bezogen auf das Transkriptions- oder Translationsprodukt unter den genannten Bedingungen bestimmt wird, und in Schritt (c) die Ermittlung der Konzentration des Liganden in der Probe durch Vergleich der ermittelten Werte mit entsprechenden Werten, die für bekannte Standardkonzentrationen des Liganden ermittelt wurden, erfolgt.

48. Assay nach Anspruch 46, dadurch gekennzeichnet, daß in Schritt (a) Zellen, bei denen der inaktive bzw. inaktivierbare Ras- oder Ras-ähnliche Signalweg ein Signalweg ist, der auf den Zellzyklus einwirkt und dessen Aktivierung für die Zellvermehrung essenziell ist, eingesetzt werden und der quantitative Nachweis des Ausmaßes der Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweges in Schritt (b) indirekt erfolgt, indem die Vermehrung der Zellen zu einem festgelegten Zeitpunkt oder die Vermehrungsrate der Zellen unter den genannten Bedingungen bestimmt wird, und in Schritt (c) die Ermittlung der Konzentration des Liganden in der Probe durch Vergleich der ermittelten Werte mit entsprechenden Werten, die für bekannte Standardkonzentrationen des Liganden ermittelt wurden, erfolgt.

49. *in vivo*-Assay zum Nachweis, ob eine Verbindung in der Lage ist, eine Bindungsaktivität eines Ligandenbindungsabschnitts eines Rezeptors gegenüber einem Liganden zu verändern, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

- (a) Inkontaktbringen des Liganden in Anwesenheit der Verbindung mit Zellen nach einem der Ansprüche 30 bis 34 unter Bedingungen, bei denen bei Fehlen des Membranrezeptors der Ras- oder Ras-ähnliche Signalweg in den Zellen nicht aktiviert werden kann, wobei der Membranrezeptor den genannten Ligandenbindungsabschnitt enthält und das Effektorprotein oder -polypeptid, dessen Bindung an eine Membrankomponente von der Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors, wie in Anspruch 1 definiert, abhängig ist, in der Lage ist, diesen Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg zu aktivieren,
- (b) Untersuchen, ob und gegebenenfalls in welchem Ausmaß eine Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweges erfolgt ist,
- (c) Vergleichen des Untersuchungsergebnisses von Schritt (b) mit einem Untersuchungsergebnis, das bei Ausführen des Assay in Abwesenheit der Verbindung erhalten wird.

50. Assay nach Anspruch 49, dadurch gekennzeichnet, daß Schritt (b) umfaßt, die Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweges über eine gegebenenfalls erfolgende Expression eines Reportergens, die nur aufgrund der infolge der Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweges erfolgenden Aktivierung eines spezifischen Transkriptionsfaktors erfolgt, nachzuweisen und der gegebenenfalls erfolgende quantitative Nachweis des Ausmaßes der Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweges umfaßt, die in den Zellen vorliegende Menge an Transkriptions- oder Translationsprodukt des Reportergens zu einem bestimmten Zeitpunkt oder die Expressionsrate dieses Reportergens bezogen auf das Transkriptions- oder Translationsprodukt unter den genannten Bedingungen zu bestimmen, wobei in dem Falle, wo der Vergleich in Schritt (c) ergibt, daß in Anwesenheit der Verbindung eine stärkere Expression des Reportergens auftritt, eine Agonistenwirkung der Verbindung und in dem Falle, wo der Vergleich in Schritt (c) ergibt, daß in Anwesenheit der Verbindung eine geringere Expression des Reportergens auftritt, eine Antagonistenwirkung der Verbindung angezeigt wird.

51. Assay nach Anspruch 50, dadurch gekennzeichnet, daß er unter Bedingungen durchgeführt wird, bei denen keine Vermehrung der Zellen auftritt.

52. Assay nach Anspruch 49, wobei in Schritt (a) Zellen, bei denen der inaktive Ras- oder Ras-ähnliche Signalweg ein Signalweg ist, der auf den Zellzyklus einwirkt und dessen Aktivierung für die Zellvermehrung essenziell ist, eingesetzt werden und Schritt (b) umfaßt, zu untersuchen, ob und gegebenenfalls in welchem Ausmaß die Zellen unter den genannten Bedingungen vermehrungsfähig sind, wobei in dem Falle, wo der Vergleich in Schritt (c) ergibt, daß in Anwesenheit der Verbindung eine stärkere Zellvermehrung auftritt, eine Agonistenwirkung der Verbindung und in dem Falle, wo der Vergleich in Schritt (c) ergibt, daß in Anwesenheit der Verbindung eine geringere Zellvermehrung auftritt, eine Antagonistenwirkung der Verbindung angezeigt wird.

53. *in vivo*-Assay zum Nachweis, ob ein Polypeptid oder Protein eine Ligandenbindungsfunktion eines Rezeptors aufweist, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

(a) Inkontaktbringen von Zellen nach einem der Ansprüche 30 bis 34 mit dem Liganden unter Bedingungen, bei denen bei Fehlen des Membranrezeptors, wie in Anspruch 1 definiert, ein Ras- oder Ras-ähnlicher Signalweg in den Zellen nicht aktiviert werden kann, wobei der Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors das zu untersuchende Polypeptid oder Protein umfaßt oder daraus besteht und wobei das Effektorprotein oder -polypeptid, dessen Bindung an eine Membrankomponente von der Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors abhängig ist, in der Lage ist, den inaktiven Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg zu aktivieren,

(b) Untersuchen, ob eine Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs erfolgt ist, wobei ein Nachweis der Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweges anzeigt, daß der Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors und dementsprechend das zu untersuchende Polypep-

tid oder Protein eine Ligandenbindungsfunktion eines Rezeptors aufweist.

54. Assayverfahren nach Anspruch 53, dadurch gekennzeichnet, daß der Ligandenbindungsabschnitt des in den Zellen enthaltenen Membranrezeptors von einem natürlich vorkommenden Rezeptorabschnitt durch Mutation abgeleitet ist.

55. Assay nach Anspruch 53 oder 54, wobei Schritt (b) umfaßt, die Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs über die gegebenenfalls erfolgende Expression eines Reportergens, die nur aufgrund der infolge der Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs erfolgenden Aktivierung eines spezifischen Transkriptionsfaktors erfolgt, nachzuweisen, wobei der Nachweis der Expression des Reportergens die Ligandenbindungsfunktion des Ligandenbindungsabschnitts des Membranrezeptors und dementsprechend des zu untersuchenden Polypeptids oder Proteins anzeigt.

56. Assay nach Anspruch 53 oder 54, wobei in Schritt (a) Zellen, bei denen der inaktive bzw. inaktivierbare Ras- oder Ras-ähnliche Signalweg ein Signalweg ist, der auf den Zellzyklus einwirkt und dessen Aktivierung für die Zellvermehrung essenziell ist, eingesetzt werden und Schritt (b) umfaßt, zu untersuchen, ob die Zellen unter den genannten Bedingungen vermehrungsfähig sind, wobei ein Nachweis der Vermehrungsfähigkeit der Zellen die Ligandenbindungsfunktion des Ligandenbindungsabschnitts des Membranrezeptors und dementsprechend des zu untersuchenden Polypeptids oder Proteins anzeigt.

57. Kit zur Verwendung in einem Assay nach einem der Ansprüche 35 bis 52, welcher Zellen nach einem der Ansprüche 30 - 34 umfaßt.

58. Kit zur Verwendung in einem Assay nach einem der Ansprüche 35 bis 52, welcher mindestens zwei der folgenden Komponenten umfaßt:

(a) Zellen, in denen zumindest unter bestimmten Bedingungen ein Ras- oder Ras-ähnlicher Signalweg nicht aktiviert werden kann;

(b) einen Nukleinsäurevektor, in den eine DNA-Sequenz exprimierbar eingefügt ist, die einen Membranrezeptor, wie in Anspruch 1 definiert, kodiert, wobei das Effektorprotein oder -polypeptid, dessen Bindung an eine Membrankomponente von der Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors abhängig ist, in der Lage ist, den inaktiven Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg in den unter (a) genannten Zellen zu aktivieren;

(c) einen Nukleinsäurevektor, in den eine DNA-Sequenz exprimierbar eingefügt ist, die das Effektorprotein oder -polypeptid, das im Falle einer Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors an eine Komponente der Membran, gegebenenfalls über weitere Proteine oder Polypeptide (Adaptoren), binden kann, kodiert;

(d) einen Nukleinsäurevektor, in den eine DNA-Sequenz exprimierbar eingefügt ist, die mindestens ein Adaptorprotein, über welches das Effektorprotein oder -polypeptid bei Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors an eine Komponente der Membran binden kann, kodiert.

59. Kit zur Verwendung in einem Assay nach einem der Ansprüche 35 bis 52, welcher mindestens zwei der folgenden Komponenten umfaßt:

(a) Zellen, in denen zumindest unter bestimmten Bedingungen ein Ras- oder Ras-ähnlicher Signalweg nicht aktiviert werden kann;

(b) einen Nukleinsäurevektor, der in geeigneter Anordnung umfaßt:

- einen DNA-Abschnitt, der ein Membranlokalisierungssignal eines Membranrezeptors, wie in Anspruch 1 definiert, kodiert;

- einen DNA-Abschnitt, der einen Mediatorabschnitt eines Membranrezeptors, wie in Anspruch 1 definiert, kodiert; und

- eine geeignet angeordnete Insertionsstelle zur funktionalen Insertion einer DNA-Sequenz, die einen Ligandenbindungsabschnitt, wie in Anspruch 1 definiert, kodiert,

wobei nach Insertion einer DNA-Sequenz für den Ligandenbindungsabschnitt der Nukleinsäurevektor ein vollständiges exprimierbares Gen für einen Membranrezeptor, wie in Anspruch 1 definiert, umfaßt, wobei das Effektorprotein oder -polypeptid, dessen Bindung an eine Membrankomponente von der Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors abhängig ist, in der Lage ist, den inaktiven Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg in den unter (a) genannten Zellen zu aktivieren;

(c) einen Nukleinsäurevektor, in den eine DNA-Sequenz exprimierbar eingefügt ist, die das Effektorprotein oder -polypeptid, das im Falle einer Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors an eine Komponente der Membran, gegebenenfalls über weitere Proteine oder Polypeptide (Adaptoren), binden kann, kodiert;

(d) einen Nukleinsäurevektor, in den eine DNA-Sequenz exprimierbar eingefügt ist, die mindestens ein Adaptorprotein, über welches das Effektorprotein oder -polypeptid bei Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors an eine Komponente der Membran binden kann, kodiert.

60. Kit nach Anspruch 58 oder 59, wobei die DNA-Sequenz in dem Nukleinsäurevektor der Komponente (c) ein Effektorprotein oder -polypeptid in Form eines Fusionsproteins aus einem Effektorabschnitt und einem Adaptorprotein oder -polypeptid, das die Bindung an eine Komponente der Membran, gegebenenfalls über weitere Proteine oder Polypeptide (Adaptoren), ermöglicht, kodiert.

61. Kit zur Verwendung in einem Assay nach einem der Ansprüche 53 bis 56, welcher Zellen nach einem der Ansprüche 30 - 34 umfaßt, wobei der darin enthaltene Membranrezeptor, wie in Anspruch 1 definiert, einen Ligandenbindungsabschnitt, umfassend ein oder bestehend aus einem Polypeptid oder Protein, bei dem eine Ligandenbindungsfunktion eines Rezeptors vermutet wird, umfaßt.



62. Kit zur Verwendung in einem Assay nach einem der Ansprüche 53 bis 56, welcher mindestens zwei der folgenden Komponenten umfaßt:

(a) Zellen, in denen zumindest unter bestimmten Bedingungen ein Ras- oder Ras-ähnlicher Signalweg nicht aktiviert werden kann;

(d) einen Nukleinsäurevektor, in den eine DNA-Sequenz exprimierbar eingefügt ist, die einen Membranrezeptor, wie in Anspruch 1 definiert, kodiert, wobei der Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors ein Polypeptid oder Protein, bei dem eine Ligandenbindungsfunktion eines Rezeptors vermutet wird, umfaßt oder daraus gebildet wird und das Effektorprotein oder -polypeptid, dessen Bindung an eine Membrankomponente von der Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors abhängig ist, in der Lage ist, den inaktiven Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg in den unter (a) genannten Zellen zu aktivieren;

(e) einen Nukleinsäurevektor, in den eine DNA-Sequenz exprimierbar eingefügt ist, die das Effektorprotein oder -polypeptid, das im Falle einer Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors an eine Komponente der Membran, gegebenenfalls über weitere Proteine oder Polypeptide (Adaptoren), binden kann, kodiert;

(d) einen Nukleinsäurevektor, in den eine DNA-Sequenz exprimierbar eingefügt ist, die mindestens ein Adaptorprotein, über welches das Effektorprotein oder -polypeptid bei Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors an eine Komponente der Membran binden kann, kodiert.

63. Kit zur Verwendung in einem Assay nach einem der Ansprüche 53 bis 56, welcher mindestens zwei der folgenden Komponenten umfaßt:

(a) Zellen, in denen zumindest unter bestimmten Bedingungen ein Ras- oder Ras-ähnlicher Signalweg nicht aktiviert werden kann;

(b) einen Nukleinsäurevektor, der in geeigneter Anordnung umfaßt:

- einen DNA-Abschnitt, der ein Membranlokalisierungssignal eines Membranrezeptors, wie in Anspruch 1 definiert, kodiert;

- einen DNA-Abschnitt, der einen Mediatorabschnitt eines Membranrezeptors, wie in Anspruch 1 definiert, kodiert; und
- eine geeignet angeordnete Insertionsstelle zur funktionalen Insertion einer DNA-Sequenz, die ein Polypeptid oder Protein, bei dem eine Ligandenbindungsfunktion eines Rezeptors vermutet wird, kodiert,

wobei nach Insertion einer DNA-Sequenz für den Ligandenbindungsabschnitt der Nukleinsäurevektor ein vollständiges exprimierbares Gen für einen Membranrezeptor umfaßt, wobei das Effektorprotein oder -polypeptid, dessen Bindung an eine Membrankomponente von der Bindung eines Liganden an den aus dem Polypeptid oder Protein, bei dem eine Ligandenbindungsfunktion eines Rezeptors vermutet wird, gebildeten Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors abhängig ist, in der Lage ist, den inaktiven Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg in den unter (a) genannten Zellen zu aktivieren;

(c) einen Nukleinsäurevektor, in den eine DNA-Sequenz exprimierbar eingefügt ist, die das Effektorprotein oder -polypeptid, das im Falle einer Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors an eine Komponente der Membran, gegebenenfalls über weitere Proteine oder Polypeptide (Adaptoren), binden kann, kodiert;

(d) einen Nukleinsäurevektor, in den eine DNA-Sequenz exprimierbar eingefügt ist, die mindestens ein Adaptorprotein, über welches das Effektorprotein oder -polypeptid bei Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors an eine Komponente der Membran binden kann, kodiert.

64. Kit nach Anspruch 62 oder 63, wobei die DNA-Sequenz in dem Nukleinsäurevektor der Komponente (c) ein Effektorprotein oder -polypeptid in Form eines Fusionsproteins aus einem Effektorabschnitt und einem Adaptorprotein oder -polypeptid, das die Bindung an eine Komponente der Membran, gegebenenfalls über weitere Proteine oder Polypeptide (Adaptoren), ermöglicht, kodiert.

65. Kit nach einem der Ansprüche 56 bis 64, in welchem die Zellen zusätzlich ein Konstrukt enthalten, umfassend eine Bindungs-

stelle für einen Transkriptionsfaktor, dessen Aktivierung infolge einer Aktivierung eines speziellen Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs, dessen Aktivierung durch den Assay nachgewiesen werden soll, erfolgt, einen Minimalpromotor und ein damit funktional verknüpftes Reportergen, wobei der Minimalpromotor infolge einer Bindung des aktivierten Transkriptionsfaktors an seine Bindungsstelle aktiviert wird.

66. Kit nach einem der Ansprüche 56 bis 64, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich einen Transformations- oder Transfektionsvektor mit einem Konstrukt, umfassend eine Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor, dessen Aktivierung infolge einer Aktivierung eines speziellen Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs, dessen Aktivierung durch den Assay nachgewiesen werden soll, erfolgt, einen Minimalpromotor und ein damit funktional verknüpftes Reportergen, wobei der Minimalpromotor infolge einer Bindung des aktivierten Transkriptionsfaktors an seine Bindungsstelle aktiviert wird, enthält.

67. Kit nach einem der Ansprüche 56 bis 64, dadurch gekennzeichnet, daß er zusätzlich einen Transformations- oder Transfektionsvektor mit einem Konstrukt, umfassend eine Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor, dessen Aktivierung infolge einer Aktivierung eines speziellen Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs, dessen Aktivierung durch den Assay nachgewiesen werden soll, erfolgt, einen Minimalpromotor und eine für eine durch den Minimalpromotor gesteuerte Expression geeignet angeordnete Insertionsstelle für eine Insertion eines Reportergens, wobei der Minimalpromotor infolge einer Bindung des aktivierten Transkriptionsfaktors an seine Bindungsstelle aktiviert wird, enthält.

68. Kit nach einem der Ansprüche 56 bis 67, welcher die Zellen immobilisiert oder in Mikrokammern eingeschlossen auf einem festen Träger, insbesondere auf Biochips enthält.

Methode zur zellulären High-Throughput-Detektion von  
Rezeptor-Liganden-Interaktionen

Die Erfindung bezieht sich auf das Gebiet der Molekularbiologie. Sie betrifft insbesondere Assayverfahren, die dazu dienen, spezifische Interaktionen zwischen einem extrazellulären Ligand und einem insbesondere membranständigen Rezeptor zu detektieren, und zielt u.a. darauf ab, neuartige, funktionelle Liganden für Rezeptoren zu finden wie auch eine Ligandenbindungsfunktion, die für insbesondere membranständige Rezeptoren charakteristisch ist, bei Polypeptiden oder Proteinen, bei denen eine solche Funktion vermutet wird, gegebenenfalls nachzuweisen. In diesem Zusammenhang betrifft die Erfindung auch Fusionsproteine, Nukleinsäuren, die diese Fusionsproteine kodieren, Vektoren, die diese Nukleinsäuren enthalten, Zellen, die diese Fusionsproteine enthalten, sowie Kits, die sämtlich für die erfindungsgemäßen Assayverfahren oder in Zusammenhang mit diesen eingesetzt werden können.

Zellen, vor allem Zellen in vielzelligen Organismen, sind darauf angewiesen, angemessen auf extrazelluläre Signale aus ihrer Umgebung zu reagieren. Signalzielzellen benutzen zur spezifischen Signalaufnahme membranständige Rezeptorproteine. Durch Bindung extrazellulärer Ligandenmoleküle an die extrazellulären Abschnitte des Rezeptors (Ligandenbindungsabschnitt) erfolgt eine konformationsvermittelte Signalweiterleitung über den Transmembranbereich des Rezeptors zum zytoplasmatischen Abschnitt des Rezeptors im Zellinnern (Mediatorabschnitt). So kann auf der Zytoplasmaseite des Rezeptors die Ligandenbindungs-abhängige molekulare Veränderung durch Adaptormoleküle abgegriffen und an innerzelluläre Signaltransduktionswege weitergeleitet werden (Figur 1). Effekte der Rezeptor-vermittelten Signaltransduktion sind rasche Veränderungen an zytoplasmatischen Strukturen und

Prozesse der Genaktivitätsveränderung und der Vermehrung oder des Abbaus von genetischem Material im Zellkern.

Zelluläre Membranrezeptoren vermitteln also ihre intrazelluläre Signalweiterleitung über den zytoplasmatischen Mediatorabschnitt des Rezeptors. Je nach der Beschaffenheit dieses Mediatorabschnitts teilt man die Membranrezeptoren in solche ein, bei denen die Signalweiterleitung des Mediators über eine enzymatische Proteinkinase-reaktion (engl. enzyme-coupled receptors) oder über sogenannte G-Proteine (engl. G-protein-coupled receptors) erfolgt.

Zu den Enzym-gekoppelten Rezeptoren gehören solche, bei denen der enzymatisch aktive Mediatorabschnitt direkt im selben Proteinmolekül des Rezeptors sitzt, das auch den Ligandenbindungsabschnitt trägt. Paradebeispiel für diesen Rezeptortyp ist der epidermale Wachstumsfaktor ("epidermal growth factor"; EGF)-Rezeptor (Schlessinger und Ulrich, 1992). Bei anderen Enzym-gekoppelten Rezeptoren liegt der enzymatisch aktive Proteinabschnitt in einer zweiten Proteinuntereinheit vor. Paradebeispiele für diesen Typ sind viele Zytokinrezeptoren (Stahl und Yancopoulos, 1993). Gemeinsam ist allen, daß die Proteinkinaseaktivität des Mediatorabschnitts des Rezeptors strikt von der Bindung des Liganden an die Ligandenbindungsdomäne des Rezeptors abhängig ist. Viele der Enzym-gekoppelten Rezeptoren geben ihr Signal über Adaptorproteine und -polypeptide an Mitglieder der Ras-Familie von monomeren GTPasen weiter, die unter anderem eine Serin/Threonin-Phosphorylierungskaskade aktivieren können (Nishida und Gotoh, 1993).

Bei den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren wird Ligandenbindungs-abhängig die zytoplasmatische Rezeptorkonfiguration durch einen G-Proteinkomplex abgegriffen, der aus drei Untereinheiten besteht und der das Signal durch Dissoziation in einen aktivierten membrangebunden  $\beta\gamma$ -Teil und in eine aktivierte  $G\alpha$ -Proteinuntereinheit weiterleitet. Dabei tauscht die  $G\alpha$ -Proteinuntereinheit ihren für den inaktiven Zustand charakteristischen Kofaktor-GDP gegen den für den aktivierten Zustand charakteristischen Kofaktor-GTP aus, der nach GTP zu GDP-Hydrolyse die  $G\alpha$ -Proteinuntereinheit wieder inaktiviert. An diesen Kreislauf sind über

die aktivierte  $\beta\gamma$ -Untereinheit und/oder die aktivierte  $\alpha$ -Untereinheit des G-Proteinkomplexes als Mediatoren die verschiedensten Signaltransduktionswege angekoppelt. Zu den G-Proteingekoppelten Rezeptoren gehört die große Familie der 7-Transmembranrezeptoren. Diese umfassen z. B. die Toxinrezeptoren, die Geruchsrezeptoren, Neurotransmitterrezeptoren und viele Hundert mehr (Dohlman et al.; 1991, Leurs et al., 1998). Adaptorproteine für die G-Protein-Mediatoren sind z. B. Adenylatzyklasen, die Phospholipase C und andere G-Protein gekoppelte Rezeptorkinasen, sowie bestimmte Ionenkanäle.

Membranrezeptor-vermittelte Signaltransduktionen regeln die entscheidenden intrazellulären Prozesse zum Überleben der Zellen, zu Wachstum und Zellteilung, zur Zelldifferenzierung und zum Zelltod (der Apoptose). Fehler in diesen wichtigen Kontrollwegen, ausgelöst durch Mutationen, tragen häufig zur Krankheits- und insbesondere zur Krebsentstehung bei. Es ist verständlich, daß die Liganden-Rezeptor-Interaktion von großem wissenschaftlichen, pharmazeutischen und kommerziellem Interesse ist, da sie die prinzipielle Nahtstelle zwischen extrazellulärem Umfeld und intrazellulärem Geschehen aller lebenden Zellen darstellt. Mit Hilfe der Ligandenmoleküle kann von außen auf natürlichem Wege in fast alle wichtigen intrazellulären Prozesse eingegriffen werden bzw. bei Fehlentwicklungen gegengesteuert werden. Die Wirkung vieler Pharmazeutika basiert auf ihrer Funktion, Agonisten oder Antagonisten in der Natur vorkommender Liganden zu sein. Es ist verständlich, daß großes Interesse daran besteht, solche Rezeptor-Liganden-Interaktionen auf molekularer Ebene zu detektieren und studieren zu können.

Es existieren bereits eine Reihe von Methoden zur Detektion der Membranrezeptor-Liganden-Interaktion. Eine der Methoden nutzt die Tatsache aus, daß viele Rezeptoren aufgrund ihrer evolutionären Verwandtschaft einen sehr ähnlichen strukturellen Aufbau haben und daß funktionelle Proteinteile, sogenannte Domänen, leicht gegeneinander austauschbar sind bzw. in neuer Zusammensetzung aneinander fusioniert werden können. So können die verschiedensten extrazellulären Ligandenbindungsdomänen mit spezifischen zytosolischen Reporterdomänen verknüpft werden, um in

Zellen gewisse Vereinheitlichungen im Detektionssystem zu schaffen (siehe z.B. US-Patent 4859609). Der Nachteil dieses Verfahrens beruht auf der Notwendigkeit zur Konstruktion von funktionsfähigen, rekombinanten Rezeptorfusionsproteinen, die in Zellen selektiv auf die zu testende Rezeptor-Liganden-Interaktion reagieren.

Ein anderer Ansatz zum Studium von Membranrezeptor-Liganden-Interaktionen geht von unveränderten Wildtyprezeptoren aus, macht sich aber gegen die spezifischen Konfigurationszustände der zytosolischen Rezeptordomäne gerichtete Antikörper zunutze um die Liganden-Interaktion zu messen.

Ein weiterer Ansatz detektiert die Rezeptor-Liganden-Interaktion *ex vivo*, also außerhalb der lebenden Zelle, indem entweder extrazelluläre Rezeptordomänen oder das Ligandenmolekül auf eine Matrix aufgebracht werden, die dann mit einer Lösung, die den Liganden bzw. den Rezeptor enthält, umspült werden. Hier ist der Aufwand zur Gewinnung und Aufbringung jedes einzelnen Rezeptors oder Liganden auf die entsprechende Matrixoberfläche enorm. Ein weiteres Problem ist hierbei auch die Übertragung der gewonnenen Resultate auf die Verhältnisse in der Membran der lebenden Zellen, da die zellulären Bedingungen von den *ex vivo*-Bedingungen erheblich abweichen können. Das gravierendste Problem ist dabei aber die fehlende Zugriffsmöglichkeit auf die genetische Information der in Screens oder High-Throughput-Assays detektierten, neuen Rezeptorvarianten.

Die der Erfindung zugrundeliegende Aufgabe besteht darin, alternative Assays, die dazu geeignet sind, spezifische Interaktionen zwischen einem Ligand und einem insbesondere membranständigen Rezeptor *in vivo* zu detektieren, bereitzustellen, die u.a. die Vorteile bieten, Liganden-Rezeptor-Wechselwirkungen schneller als im Stand der Technik möglich detektieren zu können und auch mittels einfacher handzuhabender Zellen, wie prokaryotischen Zellen oder Hefezellen, oder auch mittels "ghosts"-Formen von Hefen ausgeführt werden zu können. Darüber hinaus besteht aufgrund der Assaygestaltung stets eine unmittelbare Zugriffsmöglichkeit auf die einer Rezeptorvariante zugrundeliegende genetische Information.

Weitere Aufgaben der Erfindung bestehen darin, Zellen, Kits, Fusionsproteine, Nukleinsäuren und Vektoren bereitzustellen, die sämtlich für die erfindungsgemäßen Assayverfahren oder in Zusammenhang mit diesen eingesetzt werden können.

Die der Erfindung zugrundeliegenden Aufgaben werden durch die in den Ansprüchen definierten Assayverfahren, Kits, Zellen, Fusionsproteine, Nukleinsäuren und Vektoren erfüllt.

Die vorliegende Erfindung beruht auf den folgenden Erkenntnissen:

1. Bei jedem Membranrezeptor löst die Bindung des Liganden an die extrazelluläre Domäne eine Konfigurationszustandsänderung und/oder eine kovalente Modifikation im zytosolischen Teil aus.
2. Für jeden Membranrezeptor gibt es zytosolische, membran-nahe bzw. membranständige Adaptorproteine, die die Ligandenspezifischen Konfigurationsänderungen erkennen können oder die infolgedessen aktiviert werden.
3. Zur Aktivierung verschiedener ras- und ras-ähnlicher Signaltransduktionswege ist die Membranlokalisierung bestimmter Komponenten der Signalwege notwendig (Schlessinger, TIBS, 18: 273-275, 1993).
4. Wird nun ein Protein aus der Ras-Familie oder ein Guanin-nukleotid-Austauschfaktor ("guanine nucleotide exchange factor"; GEF) als Effektorprotein oder -polypeptid dergestalt vorgesehen, daß es bzw. er an infolge einer Ligandenbindung an die extrazelluläre Domäne eines Membranrezeptors an eine Komponente der Membran, beispielsweise an den intrazellulären Abschnitt (= Mediatorabschnitt) des Membranrezeptors oder an membran-nah oder membranständig lokalisierte Adaptorproteine, binden kann, wozu es bzw. er gegebenenfalls als Fusionsprotein vorgesehen wird, dessen zusätzlicher Proteinanteil, der auch als Adaptorabschnitt bezeichnet werden kann, die Bindung an eine derartige Komponente der Membran ermöglicht, wird bei einer solchen Bindung eine Membranlokalisierung des Ras-Proteins bzw. des GEF erreicht, die für eine Aktivierung eines ras- oder ras-ähnlichen Signaltransduktionswegs erforderlich ist.



5. Eine Detektion eines Ergebnisses einer derartigen Membranrezeptor-Liganden-Interaktion kann in eukaryotischen und gegebenenfalls auch prokaryotischen Zellen erfolgen. Im Stand der Technik sind Zellen bekannt, in denen ein ras- oder ras-ähnlicher Signaltransduktionsweg auf Ebene des dafür spezifischen Ras-Proteins oder eines für das Ras-Protein spezifischen Guaninnukleotid-Austauschfaktors zumindest unter bestimmten Bedingungen inaktiviert werden kann. Vermag in einer derartigen Zelle das unter 4. erläuterte Effektorprotein oder -polypeptid eben diesen inaktivierten Signalweg zu aktivieren, so erhält man eine Zelle, bei der der zumindest unter bestimmten Bedingungen inaktive zelleigene ras- oder ras-ähnliche Signaltransduktionsweg durch dieses Ras-Protein aktiviert werden kann - allerdings nur in Gegenwart eines Liganden für den extrazellulären Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors.

Man erhält auf diese Weise eine Zelle, in der der oder ein bestimmter ras-Signaltransduktionsweg nur in Abhängigkeit von einer Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt eines membranständigen Rezeptors aktiviert werden kann. Diese Zelle ermöglicht die Etablierung eines *in vivo*-Assayverfahrens, welches anhand des Nachweises einer gegebenenfalls erfolgten Aktivierung des speziellen ras-Signaltransduktionsweges, ggf. indirekt über an oder in der Zelle nachweisbare spezifische Auswirkungen, wie Zellwachstum, die Detektion von Interaktionen zwischen einem solchen Rezeptor und einem dafür spezifischen Liganden ermöglicht..

Somit ist ein erster Gegenstand dieser Erfindung eine Zelle, die einen zellulären Membranrezeptor umfaßt, der einen Ligandenbindungsabschnitt, ein Membranlokalisierungssignal und einen Mediatorabschnitt umfaßt, und die dadurch gekennzeichnet ist, daß nur bei Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt eine Strukturänderung, insbesondere eine Konformationsänderung und/oder eine enzymatische Modifizierung, z.B. durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung, mit Auswirkungen auf den Mediatorabschnitt bewirkt wird, so daß in der Folge ein Effektorprotein oder -polypeptid, das in der Lage ist, einen Ras- oder Ras-

ähnlichen Signalweg in der Zelle zu aktivieren, an eine Komponente der Zellmembran, und insbesondere an den Mediatorabschnitt des Rezeptorproteins, gegebenenfalls über weitere Proteine oder Polypeptide, bindet.

Der zelluläre Membranrezeptor kann ein natürlich vorkommender Rezeptor sein, wie beispielsweise ein Transmembranrezeptor, ein Enzym-gekoppelter Rezeptor, ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, ein 7-Transmembranrezeptor oder ein Geruchsrezeptor ("Odour Receptor" oder "Olfactorial Receptor"). Der zelluläre Membranrezeptor kann in der Zelle natürlicherweise vorkommen oder kann aus einem andersartigen Zellsystem stammen und in die Zelle durch Transformation oder Transfektion eingeschleust worden sein.

Alternativ kann der zelluläre Membranrezeptor auch ein in der Natur nicht vorkommender, synthetischer Rezeptor sein. Ein solcher umfaßt bevorzugt Abschnitte oder Domänen, die ihrerseits jeweils in der Natur vorkommen, wie z.B. die Aminosäuresequenz des Ligandenbindungsabschnitts eines Transmembranrezeptors, eines Enzym-gekoppelten Rezeptors, eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors, eines 7-Transmembranrezeptors oder eines Geruchsrezeptors ("Odour Receptor" oder "Olfactorial Receptor"), aber auch die eines in der Natur vorkommenden nukleären Rezeptors, wie eines Steroid-Rezeptors, Orphan-Rezeptors, Vitamin-Rezeptors, beispielsweise Vitamin D-Rezeptors, Thyroxin-Rezeptors oder Retinsäurerezeptors, oder davon durch Aminosäureanfügung, -austausch, -modifizierung, -insertion oder -deletion abgeleitete Sequenzen, kann aber auch beispielsweise mittels "molecular modelling" erzeugte Abschnitte umfassen. Beispielsweise kann ein solcher Membranrezeptor einen Ligandenbindungsabschnitt und ein Membranlokalisierungssignal, die beide von einem bestimmten Protein aus einem bestimmten Organismus abstammen, und einen Mediatorabschnitt, der von einem unterschiedlichen Protein und ggf. auch Organismus abstammt, umfassen. Insbesondere stammen der Ligandenbindungsabschnitt und der Mediatorabschnitt von unterschiedlichen Proteinen und ggf. auch Organismen ab; auch das Membranlokalisierungssignal kann dementsprechend von einem unterschiedlichen Protein und/oder Organismus abstammen oder auch synthe-

tisch erzeugt sein. Außerdem kann der Ligandenbindungsabschnitt einen in der Natur nicht vorkommenden, beispielsweise durch "molecular modelling" erzeugten synthetischen Ligandenbindungsabschnitt mit insbesondere zunächst nur vermuteter Ligandenbindungsfunktion umfassen.

In bevorzugten Ausführungsformen dieser Erfindung umfaßt das Membranlokalisierungssignal des zellulären Membranrezeptors die Aminosäuresequenz einer Transmembrandomäne, wie sie insbesondere bei Transmembranrezeptoren gefunden wird, eines Farne-sylierungssignals, Myristylierungssignals oder Prenylierungssignals oder ist davon, z.B. durch Aminosäureaustausch, -modifizierung, -insertion oder -deletion, abgeleitet.

Wie bereits angesprochen, ist das Effektorprotein oder -polypeptid, das in der Lage ist, einen Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg zu aktivieren, ein Guanine Nucleotide Exchange Factor (GEF), z.B. das CDC25-Protein aus *Saccharomyces cerevisiae* oder ein SOS-Protein aus einem Säugetier oder ein SOS-ähnliches Protein aus einem beliebigen Organismus, oder ein aktives Protein aus der Ras-Familie, ist von derartigen Faktoren oder Proteinen abgeleitet oder weist eine derartige Funktion in einem Abschnitt davon auf.

In einer besonderen Ausführungsform, die nachfolgend detaillierter erläutert wird, liegt das Effektorprotein oder -polypeptid, das in der Lage ist, einen Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg zu aktivieren, in Form eines Fusionsproteins eines Effektorabschnitts mit einem Adaptorprotein oder -polypeptid vor, das die Bindung an eine Komponente der Membran im Falle einer Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors, gegebenenfalls über weitere Proteine oder Polypeptide, ermöglicht.

In einer weiteren speziellen Ausführungsform bedarf das Fusionsprotein einer enzymatischen Modifizierung, bevor es an die Komponente der Membran, gegebenenfalls über weitere Proteine oder Polypeptide, gebunden werden kann. In diesem Falle wird in dem erfindungsgemäßen Zellsystem eine für die enzymatische Modifizierung erforderliche enzymatische Aktivität nur aufgrund einer Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt aktiviert.

In allen Fällen erfolgt in den Zellen infolge der Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors eine Translokation des Effektorproteins oder -polypeptids an die Zellmembran, wodurch die Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs ermöglicht wird. Die Translokation wird aufgrund der Bindung des Effektorproteins oder -polypeptids an eine Komponente der Membran, und in einer bevorzugten der möglichen Ausführungsformen, an den Mediatorabschnitt des zellulären Membranrezeptors, gegebenenfalls über weitere Proteine oder Polypeptide, bewirkt. Die Bindung des Effektorproteins oder -polypeptids an die Komponente der Membran ist nur bei Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt dieses Membranrezeptors möglich, da dadurch eine Strukturänderung, insbesondere Konformationsänderung mit Auswirkungen auf den Mediatorabschnitt bewirkt wird, so daß in der Folge das Effektorprotein oder -polypeptid, gegebenenfalls über weitere Proteine oder Polypeptide, an die Komponente der Membran, und in einer bevorzugten Ausführungsform an eben diesen Mediatorabschnitt bindet.

Diese Bindung des Effektorproteins oder -polypeptids an eine Komponente der Membran, gegebenenfalls über weitere Proteine oder Polypeptide, kann abhängig von dem jeweiligen Membranrezeptor und insbesondere von dem jeweiligen Mediatorabschnitt des Membranrezeptors auf unterschiedliche Weise erfolgen:

- 1) In einer ersten Variante entspricht der Mediatorabschnitt dem zytoplasmatischen Teil eines G-Protein gekoppelten Rezeptors. Alternativ umfaßt er für die nachfolgend erläuterten Eigenschaften dieses Teils G-Protein gekoppelter Rezeptoren wesentliche Abschnitte solcher Rezeptoren oder auch von den erwähnten Teilen oder Abschnitten beispielsweise durch Aminosäureanfügung, -substitution, -deletion, -insertion und/oder -modifizierung abgeleitete Sequenzen, die jedoch noch die zu erläuternden Eigenschaften der Ausgangssequenzen aufweisen.

Der den genannten Mediatorabschnitt umfassende zelluläre Membranrezeptor kann beispielsweise ein natürlich vorkommender 7-Transmembranrezeptor sein. Diese Rezeptoren umfassen z. B. die

Toxinrezeptoren, die Geruchsrezeptoren, Neurotransmitterrezeptoren und viele andere mehr (Dohlman et al.; 1991, Leurs et al., 1998).

Darüber hinaus kann der zelluläre Membranrezeptor auch ein synthetischer Rezeptor sein, z.B. mit dem zytoplasmatischen Teil eines bestimmten G-Protein-gekoppelten Rezeptors als Mediatorabschnitt und der Ligandenbindungsdomäne eines anderen G-Protein-gekoppelten Rezeptors oder auch eines andersartigen Rezeptors. Essenziell ist bei synthetischen Rezeptoren dieser Art, daß der Ligandenbindungsabschnitt bei Bindung von Ligand die natürlicherweise bei G-Protein-gekoppelten Rezeptoren in diesem Falle auftretende Strukturänderung, insbesondere Konformationsänderung mit Auswirkung auf den Mediatorabschnitt, den zytoplasmatischen Teil des Rezeptors, bewirkt.

Wie bereits erläutert, wird bei den G-Protein-gekoppelten Rezeptoren die zytoplasmatische Rezeptorkonfiguration abhängig von einer Ligandenbindung durch einen G-Proteinkomplex abgegriffen, der aus drei Untereinheiten besteht und der das Signal durch Dissoziation in einen aktivierten membrangebunden  $\beta\gamma$ -Teil und in eine aktivierte, ebenfalls membrangebundene  $G\alpha$ -Proteinuntereinheit weiterleitet. Die Aktivierung der  $G\alpha$ -Proteinuntereinheit geht einher mit einem Austausch des für den inaktiven Zustand charakteristischen Kofaktors GDP durch den für den aktivierten Zustand charakteristischen Kofaktor GTP, der nach GTP zu GDP-Hydrolyse die  $G\alpha$ -Proteinuntereinheit wieder inaktiviert.

Die Weiterleitung des Signals aus der G-Protein-Aktivierung, d.h. -Dissoziation, bzw. -Inaktivierung, d.h. -Reassoziierung, zu den G-Protein-Mediatoren, diversen Signaltransduktionswegen, die ihrerseits auf den zellulären Stoffwechsel einwirken, vermitteln sogenannte Adaptorproteine. Adaptorproteine für die G-Protein-Mediatoren sind z. B. Adenylatzyklasen, die Phospholipase C und andere G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinasen, sowie bestimmte Ionenkanäle. Einige von diesen binden insbesondere an den nach wie vor mit dem Mediatorabschnitt assoziierten und aufgrunddessen membranständigen aktivierten  $\beta\gamma$ -Teil des G-Proteins, andere wiederum an die aktivierte, abdissoziierte, jedoch ebenfalls nach wie vor membrangebundene  $G\alpha$ -Proteinuntereinheit.

Eine Effektorprotein- bzw. -polypeptid-Translokation an die Membran kann nun

- über Vermittlung des membranständigen aktivierten  $\beta\gamma$ -Teils des G-Proteins (Variante (a)),
- über Vermittlung der von dem  $\beta\gamma$ -Teil des G-Proteins abdissoziierten, jedoch nach wie vor membrangebundenen aktivierten  $G\alpha$ -Proteinuntereinheit (Variante (b)) oder
- über den Mediatorabschnitt des Membranrezeptors in seiner speziellen Struktur, wie sie nach Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors vorliegt, (Variante (c)) erfolgen.

Varianten (a) und (b):

Eine Effektorprotein- bzw. -polypeptid-Translokation an die Membran über Vermittlung des membranständigen aktivierten  $\beta\gamma$ -Teils des G-Proteins (Variante (a)) bzw. über Vermittlung der von dem  $\beta\gamma$ -Teil des G-Proteins abdissoziierten, jedoch nach wie vor membrangebundenen aktivierten  $G\alpha$ -Proteinuntereinheit (Variante (b)) kann

-- durch "Bindung" an den membrangebundenen aktivierten  $\beta\gamma$ -Teil (Variante (a)) bzw. an die abdissoziierte membrangebundene aktivierte  $G\alpha$ -Proteinuntereinheit des G-Proteins (Variante (b)) direkt (Alternative (i)),

-- über eines der genannten Adaptorproteine, die mit dem membranständigen aktivierten  $\beta\gamma$ -Teil des G-Proteins (Variante (a)) oder mit der abdissoziierten membrangebundenen aktivierten  $G\alpha$ -Proteinuntereinheit des G-Proteins (Variante (b)) assoziiert sind, (Alternative (ii)) oder

-- über eine "Bindung" an ein membranständiges Molekül, das durch Vermittlung des aktivierten  $\beta\gamma$ -Teils (Variante (a)) oder der aktivierten  $G\alpha$ -Proteinuntereinheit (Variante (b)) des G-Proteins in einem speziellen modifizierten Zustand vorliegt, (Alternative (iii)) erfolgen.

Für Alternative (i) wird das Effektorprotein oder -polypeptid in der Zelle z.B. in Form eines Fusionsproteins eines Effektorabschnitts, der die Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs bewirken kann, mit einem mit dem  $\beta\gamma$ -Teil des G-Pro-

teins nach Abdissoziation der  $\alpha$ -Untereinheit (Variante (a)) oder mit der aktivierten  $G\alpha$ -Proteinuntereinheit nach Abdissoziation von dem  $\beta\gamma$ -Teil des G-Proteins (Variante (b)) wechselwirkenden Adaptorprotein, insbesondere einer Kinase oder einer Phospholipase C, z.B. einer GRK2- oder GRK3-Kinase (GRK = "G-protein coupled receptor kinase") oder einer Phosphatidylcholin-Phospholipase C, vorgesehen.

Alternativ kann für Alternative (i) das Effektorprotein oder -polypeptid auch in Form eines Fusionsproteins des Effektorabschnitts mit einem Antikörper, der spezifisch den  $\beta\gamma$ -Teil des G-Proteins nur nach Abdissoziation der  $\alpha$ -Untereinheit (Variante (a)) bzw. spezifisch die aktivierte  $G\alpha$ -Proteinuntereinheit nach Abdissoziation von dem  $\beta\gamma$ -Teil des G-Proteins (Variante (b)) erkennt, bereitgestellt werden.

Für Alternative (ii) kann das Effektorprotein oder -polypeptid u.a. als Fusionsprotein bereitgestellt werden, dessen Adaptorabschnitt an ein Adaptorprotein mit in der Regel enzymatischer Aktivität, wie sie vorstehend speziell für eine Wechselwirkung mit G-Proteinen beispielhaft angeführt wurden, wobei das Adaptorprotein spezifisch mit dem  $\beta\gamma$ -Teil des G-Proteins nur nach Abdissoziation der  $\alpha$ -Untereinheit (Variante (a)) bzw. mit der aktivierten  $G\alpha$ -Proteinuntereinheit nur nach Abdissoziation von dem  $\beta\gamma$ -Teil des G-Proteins (Variante (b)) assoziieren oder wechselwirken kann, bindet. Den Adaptorabschnitt des Fusionsproteins kann dabei insbesondere ein Antikörper bilden, der das Adaptorprotein spezifisch erkennt und bindet.

In einem weiteren Falle weist auch das Adaptorprotein Antikörpereigenschaft auf, wobei das Adaptorprotein entweder spezifisch den  $\beta\gamma$ -Teil des G-Proteins nur nach Abdissoziation der  $\alpha$ -Untereinheit (Variante (a)) oder die aktivierte  $G\alpha$ -Proteinuntereinheit nur nach Abdissoziation von dem  $\beta\gamma$ -Teil des G-Proteins (Variante (b)) erkennt. Bei dieser Konstellation weist der Adaptorabschnitt des Fusionsproteins in der Regel die Funktion eines sogenannten "sekundären Antikörpers" oder anti-Antikörpers, welcher den mit dem Mediatorabschnitt assoziierten, sogenannten "primären" Antikörper erkennt, auf.

Für Alternative (iii) wird die Tatsache ausgenutzt, daß ein G-Protein in aktiviertem Zustand eine Phosphatidylinositol-3-kinase (PI3K) aktivieren kann, die ihrerseits infolge der Aktivierung sogenannte "second messenger"-Verbindungen durch Phosphorylierung der D-3-Position des Inositolrings von Phosphoinositiden (z.B.  $\text{PtdIns}(3,4)\text{P}_2$  (AKT) oder  $\text{PtdIns}(3,4,5)\text{P}_3$  (BTK)) erzeugt. Diese Phosphoinositide sind membranständig und binden in ihrem phosphorylierten Zustand sogenannte "Src homology (2)" (SH2)- und "pleckstrin homology" (PH)-Domänen. Für Alternative (c) stellt man dementsprechend das Effektorprotein oder -polypeptid in einer besonderen Ausführungsform in Form eines Fusionsproteins des Effektorabschnitts, der die Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs bewirken kann, mit einer "Src homology (2)" (SH2)-Domäne oder mit einer "Pleckstrin homology" (PH)-Domäne bereit. Die Translokation des Effektorproteins oder -polypeptids in Form des Effektorabschnitts erfolgt dementsprechend nur, wenn eine Phosphorylierung zu den speziell erläuterten Phosphoinositiden infolge der G-Protein-Aktivierung erfolgt, infolgedessen die (SH2)- oder (PH)-Domänen des Fusionsproteins mit diesen Phosphoinositiden assoziieren.

#### Variante c:

Wie erläutert, kann eine Effektorprotein- bzw. -polypeptid-Translokation an die Membran alternativ auch über den Mediatorabschnitt des Membranrezeptors in seiner speziellen Struktur, wie sie nach Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors vorliegt, erfolgen, und zwar

- durch direkte "Bindung" an den Mediatorabschnitt in seiner speziellen Struktur, wie sie nach Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors vorliegt, (Alternative (i)) oder
- über ein oder mehrere Adaptorprotein(e), die mit dem Mediatorabschnitt in seiner speziellen Struktur, wie sie nach Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors vorliegt, assoziiert sind, (Alternative (ii)).

Für Alternative (i) wird das Effektorprotein oder -polypeptid in der Zelle z.B. in Form eines Fusionsproteins eines Effek-



torabschnitts, der die Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs bewirken kann, mit einem mit dem Mediatorabschnitt des Membranrezeptors nur in seiner speziellen Struktur, wie sie nach Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors vorliegt, wechselwirkenden Adaptorprotein, insbesondere einem Antikörper entsprechender Spezifität, vorgesehen.

Für Alternative (ii) dieser Variante kann das Effektorprotein oder -polypeptid insbesondere als Fusionsprotein bereitgestellt werden, dessen Adaptorabschnitt an ein Adaptorprotein, welches spezifisch mit dem Mediatorabschnitt des Membranrezeptors nur in seiner speziellen Struktur, wie sie nach Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors vorliegt, assoziieren oder wechselwirken kann, bindet. Den Adaptorabschnitt des Fusionsproteins kann dabei insbesondere ein Antikörper bilden, der das Adaptorprotein spezifisch erkennt und bindet. In dem speziellen Falle, wo auch das Adaptorprotein Antikörpereigenschaft aufweist, wobei das Adaptorprotein den Mediatorabschnitt des Membranrezeptors spezifisch nur in seiner speziellen Struktur, wie sie nach Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors vorliegt, erkennt, weist der Adaptorabschnitt des Fusionsproteins bei dieser Konstellation die Funktion eines sogenannten "sekundären Antikörpers" oder anti-Antikörpers, welcher den mit dem Mediatorabschnitt assoziierten, sogenannten "primären" Antikörper erkennt, auf.

2) Bei einer zweiten Variante werden für den zellulären Membranrezeptor Rezeptoren mit Mediatorabschnitten ausgewählt, welche bei Bindung von Ligand an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors Adaptorproteine binden können, welche die Bindung des Effektorproteins oder -polypeptids vermitteln.

Die hierfür geeigneten Membranrezeptoren, die ggf. auch nur den Mediatorabschnitt bereitstellen, sind insbesondere Enzym-gekoppelte Rezeptoren mit eigener enzymatischer Aktivität und insbesondere mit Kinaseaktivität, beispielsweise Tyrosinkinaseaktivität, Serin/Threoninkinaseaktivität oder Phospha-

taseaktivität, welche im zytoplasmatischen Abschnitt des Rezeptors lokalisiert ist. Die enzymatische Aktivität des Mediatorabschnitts wird dabei stets erst bei Bindung von Ligand an die Ligandenbindungsdomäne des Membranrezeptors infolge der durch die Ligandenbindung bewirkten Struktur- und insbesondere Konformationsänderung aktiv. Die enzymatische Aktivität ist dabei bei bestimmten Ausführungsformen für die bei Ligandenbindung mögliche Bindung des oder der Adaptorprotein(e) an den Mediatorabschnitt mit erforderlich, z.B. über eine z.T. mehrfache Phosphorylierung des Mediatorabschnitts (vgl. Fig. 2a und 3) und/oder auch über eine Phosphorylierung von Adaptorprotein(en). Ein Beispiel für einen entsprechenden natürlich vorkommenden Enzym-gekoppelten Rezeptor ist der epidermaler Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR), der eine Tyrosinkinaseaktivität aufweist (vgl. Fig. 3).

Die hier einsetzbaren Membranrezeptoren können wie bei 1) natürlich vorkommende Rezeptoren, von solchen Rezeptoren abgeleitete Rezeptoren oder auch synthetische Rezeptoren sein, die insbesondere Abschnitte verschiedenen Ursprungs mit den vorstehend erwähnten Funktionen, wie Membranlokalisierung, Ligandenbindung und Mediatorfunktion, umfassen. Diese Abschnitte können ihrerseits von natürlich vorkommenden Rezeptoren oder andersartigen Proteinen abstammen oder von solchen nach den bereits erläuterten Maßgaben abgeleitet sein. Essenziell ist auch bei den synthetischen Rezeptoren dieser Art, daß der Ligandenbindungsabschnitt bei Bindung von Ligand die natürlicherweise bei Enzym-gekoppelten Rezeptoren in diesem Falle auftretenden Struktur- und insbesondere Konformationsänderungen mit Auswirkung auf den Mediatorabschnitt und insbesondere auf die in diesem Abschnitt lokalisierte enzymatische Aktivität bewirkt.

Eine Effektorprotein- bzw. -polypeptid-Translokation an die Membran kann nun durch Bindung des Effektorproteins oder -polypeptids an das aufgrund einer Bindung an den Mediatorabschnitt membranständige Adaptorprotein erfolgen (Alternative (a)) oder durch Verwendung eines Fusionsproteins, das das Effektorprotein

oder -polypeptid in Fusion mit dem Adaptorprotein enthält (Alternative (b)).

Für Alternative (a) können in einer besonderen Ausführungsform Mediatorabschnitte von Membranrezeptoren gewählt werden, die im Falle einer Bindung von Ligand an ihren Ligandenbindungsabschnitt Adaptorproteine binden, an die natürlicherweise eine Bindung von Guaninnukleotid-Austauschfaktor (GEF) erfolgt. Ein Beispiel für einen derartigen Membranrezeptor stellen der epidermale Wachstumsfaktor-Rezeptor (EGFR) und die für dessen zytoplasmatischen oder Mediatorabschnitt spezifischen Adaptorproteine Grb2 und Shc dar. An diese Adaptorproteine Grb2 und Shc, die an den Mediatorabschnitt des EGFR nur im Falle einer Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt von diesem binden, bindet wiederum ein Guaninnukleotidaustauschfaktor, der in der Lage ist, einen Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg in einer Zelle zu aktivieren.

In einer weiteren Ausführungsform der Alternative (a) kann das Effektorprotein oder -polypeptid jedoch auch in Form eines Fusionsproteins aus einem Effektorabschnitt, der in der Lage ist, einen Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg in einer Zelle zu aktivieren, und einem Abschnitt mit Antikörpereigenschaft bereitgestellt werden, wobei der Abschnitt mit Antikörpereigenschaft spezifisch das oder die Adaptorprotein(e) erkennt und bindet, die infolge einer Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors an den Mediatorabschnitt von diesem gebunden werden.

Bei einer speziellen Variante dieser Ausführungsform stellt das Adaptorprotein kein natürlicherweise vorkommendes Adaptorprotein, wie Grb2 oder Shc, oder ein davon abgeleitetes Adaptorprotein dar, sondern weist ebenfalls Antikörpereigenschaft auf, wobei das Antikörper-Adaptorprotein, wie soeben erläutert, den Mediatorabschnitt des Membranrezeptors nur infolge einer Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt desselben erkennt und bindet. In diesem Falle weist der Adaptorabschnitt des Fusionsproteins dann die Funktion eines sogenannten "sekundären Antikörpers" oder anti-Antikörpers, welcher den mit dem Mediator-

abschnitt assoziierten, sogenannten "primären" Antikörper erkennt, auf.

In Alternative (b) wird das Effektorprotein in Form eines Fusionsproteins, das den Effektorabschnitt in Fusion mit dem Adaptorprotein enthält, vorgesehen. Durch die Bindung des Adaptorproteinabschnitts des Fusionsproteins an den Mediatorabschnitt eines Membranrezeptors infolge der Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt von diesem wird über die kovalente Verknüpfung innerhalb des Fusionsproteins auch der Effektorabschnitt an die Membran geführt und kann dort seine Wirkung zur Aktivierung eines Ras- oder RAS-ähnlichen Signalwegs ausüben.

Ein Beispiel für diese Variante (b) ist ein Fusionsprotein, das als Adaptorabschnitt ein Gbr2- oder Shc-Protein, fusioniert mit einem bevorzugt konstitutiv aktiven ras-Protein, beispielsweise dem humanen konstitutiv aktiven ras-Protein (H-ras, L61), oder einem funktionalen GEF als Effektorabschnitt, umfaßt. Ein solches Fusionsprotein wird z.B. wieder in Verbindung mit einem EGFR-Membranrezeptor oder mit einem Rezeptor, der den zytoplasmatischen Teil von diesem umfaßt, eingesetzt, wobei der zytoplasmatische oder Mediatorabschnitt des EGFR mit dem Gbr2- oder Shc-Anteil des Fusionsproteins bei Bindung von Ligand wechselwirkt und darüber den Effektorabschnitt an die Membran führt (vgl. auch Fig. 2a, 3).

Ein weiteres Beispiel für diese Variante (b) ist ein Fusionsprotein, das als Adaptorabschnitt einen Antikörper aufweist, der spezifisch den Mediatorabschnitt des Membranrezeptors nur in seiner Struktur/Konformation nach Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt erkennt und bindet.

3) Eine dritte Variante ist der zweiten Variante ähnlich, wobei jedoch der als Membranrezeptor eingesetzte bzw. für die Gestaltung des Mediatorabschnitts des Membranrezeptors herangezogene Enzym-gekoppelte Rezeptor keine eigene enzymatische Aktivität aufweist, die bei Ligandenbindung aktiviert wird, sondern

vielmehr in strikter Abhängigkeit von einer eigenen Aktivierung durch Ligandenbindung ein separates rezeptorspezifisches Enzym aktiviert, das sich z.B. auf einer separaten Untereinheit befindet. Als Beispiele für einen derartigen Rezeptortyp können diverse Zytokinrezeptoren genannt werden.

Dieses separate rezeptorspezifische Enzym kann in einer besonderen Ausführungsform auch zu der Zelle heterolog sein. Bevorzugt ist das separate rezeptorspezifische Enzym ebenfalls eine Kinase und insbesondere eine Tyrosinkinase. Wieder führt die Kinaseaktivität bevorzugt zur Phosphorylierung des Mediatorabschnitts, d.h. des zytoplasmatischen Abschnitts des Membranrezeptors und wirkt damit zusätzlich auf die Bindung eines für den Mediatorabschnitt spezifischen Adaptorproteins ein.

Ansonsten gilt gleiches wie für den Membranrezeptor von Variante 2), d.h. dieser kann ein natürlich vorkommender Membranrezeptor, ein von einem solchen Membranrezeptor abgeleiteter Membranrezeptor oder ein synthetischer Membranrezeptor sein, dessen verschiedene Domänen oder Abschnitte aus unterschiedlichen Quellen stammen, die ggf. auch von natürlich vorkommenden Sequenzen abgeleitet sein können.

Wie bei Variante 2) kann auch hier die Effektorprotein- bzw. -polypeptid-Translokation an die Membran durch Bindung des Effektorproteins oder -polypeptids an ein aufgrund einer Bindung an den Mediatorabschnitt membranständiges Adaptorprotein erfolgen (Alternative (a)) oder durch Verwendung eines Fusionsproteins, das das Effektorprotein oder -polypeptid in Fusion mit dem Adaptorprotein enthält (Alternative (b)).

Auch in diesem Falle können als Beispiele für mögliche Adaptorproteine Grb2 oder Shc aufgeführt werden, die gegebenenfalls auch als Fusionsproteine mit einem Effektorabschnitt, der in der Lage ist, den Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg zu aktivieren, eingesetzt werden können, aber auch Antikörper, die spezifisch den Mediatorabschnitt des Membranrezeptors nur in seiner Struktur/Konformation nach Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt erkennen und binden und in Form von Fusionsproteinen mit einem Effektorabschnitt eingesetzt werden können. Alternativ umfaßt das Antikörper-Adaptorprotein keine Effektor-

funktion, sondern wird seinerseits von einem Fusionsprotein mit einem Effektorabschnitt und einem Adaptorabschnitt mit der Funktion eines sogenannten "sekundären Antikörpers" oder anti-Antikörpers, welcher den mit dem Mediatorabschnitt assoziierten, sogenannten "primären" Antikörper (Antikörper-Adaptorprotein) erkennt, über diesen Adaptorabschnitt erkannt und gebunden.

Sollen mit Hilfe der beschriebenen Zellen die erfindungsgemäßen Assays ausgeführt werden, die, wie nachfolgend detaillierter erläutert, spezifisch die Wechselwirkung von Liganden mit dem Ligandenbindungsabschnitt von Membranrezeptoren nachweisen, versteht es sich, daß das Translokationsereignis des Effektorproteins oder -polypeptids an die Zellmembran nur bei einer Ligand-Ligandenbindungsabschnitt-Wechselwirkung an dem speziell zu untersuchenden Membranrezeptor auftreten darf. D.h. eine Assoziierung des Effektorproteins oder -polypeptids mit membranständigen Zellkomponenten, die (in Abwesenheit des Membranrezeptors und der mit diesem bei der Signaltransduktion spezifisch und ausschließlich zusammenwirkenden Zellkomponenten) natürlicherweise in diesen Zellen vorkommen, muß, gleich welchen Aktivierungs- oder Modifizierungszustands der Zellkomponenten, ausgeschlossen sein. Dies setzt voraus, daß alle Komponenten, die an der Translokation des Effektorproteins oder -polypeptids an die Zellmembran direkt und indirekt beteiligt sind, nur in Folge der Aktivierung des speziell zu testenden Membranrezeptors aufgrund der Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt, und genauer nur in Folge der durch diese Aktivierung bedingten Strukturänderung des Mediatorabschnitts in die Lage versetzt werden können, die Bindung des Effektorproteins oder -polypeptids an eine Komponente der Zellmembran zu vermitteln oder zu bewirken.

Soll in einem Test ein in einer Zelle natürlicherweise vorkommender Membranrezeptor getestet werden, muß sichergestellt werden, daß in der Zelle der Mediatorabschnitt dieses Membranrezeptors nur in Zusammenhang mit diesem vorkommt und daß die damit zusammenwirkenden Adaptor- und Vermittlerproteine nur mit diesem Mediatorabschnitt oder nur aufgrund einer Aktivierung

dieses Mediatorabschnitts in einer Weise interagieren können, daß es schließlich zu einer Translokation des Effektorproteins oder -polypeptids an die Zellmembran kommt.

Alternativ kann eine Zelle als Assayzelle ausgewählt werden, in der alle diese Komponenten vor der Einschleusung der genetischen Information für den Membranrezeptor und die gegebenenfalls benötigten Adaptor-, Vermittler- und/oder Effektorproteine bzw. -polypeptide natürlicherweise nicht vorkommen, also zu dieser Ausgangszelle heterolog sind und auch keine zelleigenen Komponenten gleicher Spezifität und ggf. Aktivität, die diese ersetzen könnten, vorliegen; bezüglich des Membranrezeptors kann dies auch nur für den Mediatorabschnitt gelten. Oder es muß dafür Sorge getragen werden, daß eine Ausgangszelle, die diese Komponenten, bezüglich des Membranrezeptors ggf. auch nur den speziellen Mediatorabschnitt, in einem ursprünglichen Zustand einmal enthielt, diese Komponenten aufgrund von genetischer oder sonstiger Modifizierung vor der Einschleusung der genetischen Information für den Membranrezeptor und die gegebenenfalls benötigten Adaptor-, Vermittler- und/oder Effektorproteine bzw. -polypeptide nicht mehr enthält. Zusammenfassend erläutert, betrifft dies zumindest die folgenden Komponenten:

- den Mediatorabschnitt,
- ggf. die damit zusammenwirkenden Adaptorproteine oder Adaptorproteinabschnitte, sofern eine Bindung des Effektorproteins oder -polypeptids an diese oder über diese erfolgt, sowie,
- z.B. im Falle der vorliegend erläuterten Alternative 1)c), ggf. eine Vermittlerkomponente, welche mit dem Mediatorabschnitt des Membranrezeptor räumlich nicht unmittelbar assoziiert sein muß, jedoch im Falle einer Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt von diesem aktiviert oder modifiziert wird und aufgrunddessen ein sekundäres Ereignis an einer weiteren Komponente der Zellmembran vermittelt, infolgedessen sich das Effektorprotein oder -polypeptid spezifisch an diese Komponente der Zellmembran, die mit dem Mediatorabschnitt des Membranrezeptors nicht assoziiert ist, bindet; alternativ darf das genannte sekundäre Ereignis in

der Zelle nur bei Ligandenbindung des Ligandenbindungsabschnitts des Membranrezeptors vermittelt werden. Es dürfen im letzteren Falle in der Zelle also keine Wechselwirkungspartner für diese Vermittler vorliegen, die eine entsprechende Aktivierungswirkung wie der Membranrezeptor auf den oder die Vermittler ausüben können.

Dementsprechend ist bei einigen Ausführungsformen der Erfindung die Expression bestimmter Typen von Proteinen und Fusionsproteinen in einem geeigneten Zellsystem, das diese Proteine und Fusionsproteine natürlicherweise nicht enthält, ein wesentlicher Aspekt. Je nach eingesetztem Membranrezeptor und insbesondere je nach dem durch den Mediatorabschnitt des Membranrezeptors bedingten Mechanismus, der schließlich zu einer Translokation des Effektorproteins oder -polypeptids an die Membran führt, kann es erforderlich werden, eines oder mehrere der vorstehend genannten Proteine in einer Zelle, die diese(s) natürlicherweise nicht enthält, zu exprimieren. Diese Proteine können in ihrer natürlich vorkommenden Form, sofern es eine solche gibt, oder in Form von Fusionsproteinen, exprimiert werden.

Ein erstes derartiges Fusionsprotein kann ein Membranrezeptor, wie er vorstehend erläutert wurde, sein, bei dem insbesondere und gegebenenfalls auch ausschließlich der Mediatorabschnitt zu der Zelle heterolog ist.

Ein weiteres dieser Fusionsproteine stellt das Effektorprotein oder -polypeptid in einer besonderen Form bereit und besteht aus Domänen bzw. Teilen, die folgende Funktionen vereinen:

- i) die membranständige spezifische Interaktion eines Adaptorabschnitts des Fusionsproteins mit einer Komponente der Membran und in einer besonderen Ausführungsform dem Mediatorabschnitt des Rezeptors in Abhängigkeit von der extrazellulären Ligandenbindung (Adaptorfunktion);
- ii) die Aktivierungsmöglichkeit eines ras- oder ras-ähnlichen Signaltransduktionsweges in Abhängigkeit von der durch den Adaptorabschnitt bedingten Membranlokalisierung aufgrund eines mit dem Adaptorabschnitt in dem Fusionsprotein fusionierten Effektorabschnitts (Effektorfunktion).



Die erstgenannte Funktion bewirkt, daß das Adaptor-Effektor-Fusionsprotein nur dann an die Membran gelangt und damit an den Wirkort desjenigen Teils des Fusionsproteins, welcher für die zweite Funktion verantwortlich ist, wenn ein Ligand an den in der Regel extrazellulären Teil, d.h. den Ligandenbindungsabschnitt des Rezeptors gebunden hat. Ohne Ligandenbindung liegt der Rezeptor in einer Konfiguration vor, die den Adaptorabschnitt nicht direkt binden kann oder einen membranständigen Folgeprozess über einen Mediator nicht auslösen kann, den der Adaptorabschnitt erkennen könnte. Bei Ligandenbindung nimmt der zytosolische Teil des Rezeptors eine Konfiguration ein, die der Adaptoranteil direkt erkennen kann oder er löst einen Folgevorgang aus, der zu einer membranständigen Proteinkonfiguration anderer Mediatorproteine führt, die der Adaptor erkennen kann. In Abwesenheit der Ligandenbindung liegt also das Adaptor-Effektor-Fusionsprotein im Zytosol nicht am Wirkort des Effektorabschnitts vor. Nur wenn der Effektorabschnitt membranständig orientiert wird, kann er als Signaltransduktionskomponente im ras- oder ras-ähnlichen Signaltransduktionsweg aktiv werden. (Fig. 2a und b).

Eine solche Aktivierung kann, wie weiter unten ausführlicher erläutert wird, detektiert werden über phänotypische Änderungen (z. B. Wachstum oder Gen- bzw. Reporterogenaktivität) in der Zelle, wobei die Zellen unter den Assaybedingungen in Abwesenheit des Liganden inaktiv bezüglich des ras- oder ras-ähnlichen Signaltransduktionsweges sein müssen.

In einem bevorzugt verwendeten experimentellen System der Erfindung umfaßt das Fusionsprotein als Effektorabschnitt ein mutiertes humanes Ras-Protein (Ha-Ras, L61), dem die Farnesylierungssequenz, welche für eine Membranlokalisierung des Proteins sorgt, fehlt.

Auch weitere Protein-Komponenten, die neben dem Membranrezeptor und insbesondere dessen Mediatorabschnitt sowie dem Effektorprotein selbst an der Translokation des Effektorproteins oder -polypeptids unmittelbar oder mittelbar beteiligt sind, können gegebenenfalls als in der Natur nicht vorkommende Fusionsproteine in der Zelle exprimiert werden.

Zum klareren Verständnis der Lehre dieser Unterlagen sei angefügt, daß im vorliegenden Zusammenhang unter dem Begriff "Ligand" nur solche Bindungspartner für Rezeptoren und insbesondere Membranrezeptoren verstanden werden sollen, die bei einer Bindung an den Ligandenbindungsabschnitt eines solchen Rezeptors eine Strukturänderung, insbesondere eine Konformationsänderung und/oder eine enzymatische Modifizierung, z.B. durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung, hervorrufen, wie sie *in vivo* bei der Bindung eines natürlichen Liganden erfolgt und wofür Beispiele vorstehend erläutert wurden. Bindungspartner, die eine solche Strukturänderung nicht hervorrufen, werden von dem Begriff "Ligand" nicht umfaßt.

Von den hier synonym verwendeten Begriffen "Ras- und Ras-ähnlicher Signalweg" oder "sich an ein Ras-Protein anschließender Signalweg" werden auch die sogenannten ras-ähnlichen Signalwege mitumfaßt, die von diversen weiteren Mitgliedern der Ras-Familie gesteuert werden. Unter den Mitgliedern der Ras-Familie gibt es solche, die trotz Ursprungs aus unterschiedlichen Organismen ein und denselben Signaltransduktionsweg in einer gewählten Zielzelle aktivieren können. Ein Beispiel hierfür ist das humane Ha-Ras (L61), das in der Lage ist, auch einen ras-Signalweg in *Saccharomyces cerevisiae* zu aktivieren, der auf den Zellzyklus einwirkt und dessen Aktivierung für eine Vermehrung der Hefezellen essenziell ist. Andere Mitglieder der Ras-Familie sind nur in der Lage, einen einzigen, für sie spezifischen Signalweg zu aktivieren.

Eine Reihe von Mitgliedern der Ras-Familie, wie das vorstehend erwähnte Ha-Ras (L61), aktiviert Signalwege, die auf den Zellzyklus einwirken und deren Aktivierung über die Aktivierung spezieller Transkriptionsfaktoren für die Zellvermehrung essenziell sind. Andere derartige Ras-Proteine aktivieren Signalwege, die spezifisch zur Aktivierung jeweils eines einer Vielzahl von Transkriptionsfaktoren, die für andere Gene als jene des Zellzyklus spezifisch sind, führen. Im vorliegenden Kontext ist allen ras-Signalwegen gemeinsam, daß sie für ihre Aktivierung ein an der Zellmembran vorliegendes aktives Ras-

Protein erfordern, wobei das Ras-Protein gegebenenfalls für seine Aktivität die gleichzeitige Anwesenheit eines Guaninnukleotid-Austauschfaktors an der Zellmembran benötigt.

Wird in diesen Unterlagen auf eine Inaktivierung eines ras-Signalwegs oder eines ras-ähnlichen Signalwegs Bezug genommen, so wird darunter stets eine Inaktivierung auf Ebene des Ras-Proteins und/oder eines dafür spezifischen Guaninnukleotid-Austauschfaktors verstanden. Die genannte Signalwegsinaktivierung tritt in einer Zelle im vorliegenden Zusammenhang bevorzugt nur unter bestimmten Umweltbedingungen, wie Temperatur, auf, kann also durch gezielte Einstellung von Umweltbedingungen induziert und wieder aufgehoben werden.

Im zellulären Kontext wird nun bei jeder der erläuterten Ausführungsformen durch Einwirkung der aktiven Signaltransduktionskomponente ein ras- oder ras-ähnlicher Signaltransduktionsweg aktiviert. Verwendet man eine Zelle, bei der dieser ras- oder ras-ähnliche Signalweg in Abwesenheit des Fusionsproteins aufgrund von Mutationen zumindest unter bestimmten Bedingungen nicht aktiviert ist, kann eine solche allein durch die infolge der Ligandenbindung erfolgte Translokation des Effektorproteins oder -polypeptids an die Zellmembran vermittelte Aktivierung über phänotypische Veränderungen, z.B. Wachstum oder Gen- bzw. Reporter-genaktivität, in der Zelle detektiert werden.

Das Effektorprotein oder -polypeptid vermag bevorzugt, ras-Signaltransduktionswege zu aktivieren, die auf den Zellzyklus einwirken und deren Aktivierung für die Zellvermehrung essenziell ist. Alternativ und ebenso bevorzugt wirkt es auf einen der Ras-Signalwege ein, die der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren für Gene dienen, die für die Zellvermehrung nicht essenziell sein müssen.

Das Effektorprotein oder -polypeptid kann die Aktivität eines aktiven und insbesondere eines konstitutiv aktiven Ras-Proteins aufweisen. Konstitutiv aktive Ras-Proteine zeigen Aktivität unabhängig von der Anwesenheit von Guaninnukleotid-Austauschfaktor-Molekülen, die diverse andere Ras-Proteine für ihre Aktivität benötigen. Zu diesem Zweck kann das Effektorpro-

tein oder -polypeptid beispielsweise die Aminosäuresequenz eines aktiven oder konstitutiv aktiven Ras-Proteins, das in der Natur vorkommt, z.B. dem humanen Ha-Ras (L61), oder von Teilen davon umfassen. Oder es kann Aminosäuresequenzen umfassen, die von derartigen Sequenzen, z.B. durch Aminosäureanfügung, -austausch, -modifizierung, -insertion oder -deletion, abgeleitet sind.

Alternativ kann das Effektorprotein oder -polypeptid die Aktivität eines funktionellen Guaninnukleotid-Austauschfaktors ("guanine nucleotide exchange factor") aufweisen. In dieser Hinsicht kann die Aminosäuresequenz des Effektorproteins oder -polypeptids ebenfalls beispielsweise Sequenzen von in der Natur vorkommenden Guaninnukleotid-Austauschfaktoren oder Teilssequenzen davon umfassen oder sie kann davon, z.B. durch Aminosäureanfügung, -austausch, -modifizierung, -insertion oder -deletion, abgeleitet sein. In einer bevorzugten Ausführungsform ist die Aminosäuresequenz des Effektorproteins oder -polypeptids abgeleitet von der Aminosäuresequenz des CDC25-Proteins aus *Saccharomyces cerevisiae*, eines SOS-Proteins aus einem Säugetier oder eines aus einem beliebigen Organismus abgeleiteten SOS-ähnlichen Proteins.

Darüber hinaus umfaßt die Erfindung DNA-Moleküle, die neue Fusionsproteine, die ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind, kodieren, sowie Vektoren, insbesondere Plasmide, Cosmide, Viren- oder Phagengenome, die mindestens eines dieser DNA-Moleküle umfassen. Besondere erfindungsgemäße Vektoren sind zur Transformation oder Transfektion von Wirtszellen oder zur Expression mindestens eines erfindungsgemäßen Fusionsproteins geeignet. Zu dem letztgenannten Zweck steht ein erfindungsgemäßes DNA-Molekül in dem Vektor unter Kontrolle eines in einer Wirtszelle funktionsfähigen Promotors, der die Expression ermöglicht und steuert.

Die Herstellung der erfindungsgemäßen Fusionsproteine, DNA-Moleküle und Vektoren kann nach im Stand der Technik bekannten Protokollen erfolgen (siehe z.B. Sambrook, J., Fritsch, E.F.,

Maniatis, T. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Handbook, Cold Spring Harbor Laboratory, New York; Current Protocols in Molecular Biology (1991)). Auch wenn die Fusionsproteine grundsätzlich vollsynthetisch aus einzelnen Aminosäure-Derivaten hergestellt werden können, wozu im Stand der Technik diverse Verfahren zur Verfügung stehen, werden sie üblicherweise über die Expression der entsprechenden Gene in Zellen produziert. Dabei kann das Gen für das Fusionsprotein extrachromosomal oder in das Genom der Wirtszelle integriert vorliegen. Die Klonierung der Gene für die Fusionsproteine ausgehend von bekannten Genabschnitten, die Proteinabschnitte mit den erforderlichen oder im Falle des Ligandenbindungs- oder Rezeptorabschnitts auch vorerst nur vermuteten Funktionen kodieren, gehört ebenso zu den Standardfähigkeiten eines Fachmanns, wie die Konstruktion von Vektoren, wie Transkriptions- oder Transfektionsvektoren oder auch Expressionsvektoren, in denen das Gen in funktionaler Verknüpfung mit einem in der Produktionszelle wirksamen Promotor vorliegt, die Transformation oder Transfektion von Wirtszellen wie auch die Züchtung der transformierten bzw. transfizierten Wirtszellen zur Produktion des Proteins. Die Isolierung und Reinigung der erfindungsgemäßen Fusionsproteine kann durch Einsatz herkömmlicher Verfahren, wie Fällung, Einsatz diverser Chromatographieverfahren, wie Gelfiltration, Affinitätschromatographie u.s.w. erfolgen. Insbesondere erlaubt die Affinitätschromatographie beispielsweise bei Verwendung von an die Matrix gebundenen spezifischen Antikörpern, die gegen eine Determinante eines bezüglich der Wirtszelle heterologen Abschnitts des Fusionsproteins gerichtet sind, eine selektive Bindung nur des Fusionsproteins. Alternativ kann das Fusionsprotein beispielsweise auch als Vorläuferprotein exprimiert werden, das eine zusätzliche Domäne mit einer spezifischen Bindungseigenschaft an eine bestimmte Affinitätssäule aufweist. Nach Bindung und darauffolgender Elution von der Affinitätssäule kann die zusätzliche Domäne dann selektiv von dem nun bereits im wesentlichen rein vorliegenden Vorläuferprotein unter Erzeugung des erfindungsgemäßen Fusionsprotein abgespalten werden. Sofern die zusätzliche Domäne die Eignung des

Fusionsproteins für die erfindungsgemäßen Assays nicht beeinflusst, besteht jedoch alternativ auch die Möglichkeit, auf den Abspaltungsschritt zu verzichten. Ein Beispiel für eine derartige Domäne besteht aus mehreren, z.B. 10, zusätzlich N-terminal angefügten Histidinresten ("His-tag"), die spezifisch an eine Metall-Chelat-Affinitätschromatographiesäule binden. Bezüglich aller genannten Techniken und den dafür erforderlichen Reagenzien, einschließlich Vektormolekülen, kann auf Standardliteratur (z.B. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989), a.a.O.; Current Protocols in Molecular Biology (1991)) und eine unübersehbare Vielzahl von Einzelprotokollen verwiesen werden.

Ein weiterer zentraler Gegenstand der Erfindung sind neben den vorstehend erläuterten Zellen auch Zellen, die eines oder mehrere der erfindungsgemäßen Fusionsproteine enthalten. Im Rahmen dieser Erfindung können dabei einzelne, mehrere oder auch alle Domänen des Fusionsproteins und/oder gegebenenfalls auch Teile eines oder mehrerer Abschnitte oder Domänen bezüglich der Wirts- oder Ausgangszelle heterolog sein.

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen Zellen kann beispielsweise eine Transformation oder Transfektion von Ausgangszellen mit einem Expressionsvektor, der ein Gen für das erfindungsgemäße Fusionsprotein unter Kontrolle eines in der Ausgangszelle funktionsfähigen Promotors enthält, erfolgen. Als Ausgangszellen kommen prokaryotische wie eukaryotische Zellen in Frage. Beispiele für Ausgangszellen sind u.a. Bakterienzellen, wie solche der Gattung *Escherichia* oder *Bacillus*, beispielsweise bestimmte Stämme von *Escherichia coli* oder *Bacillus subtilis*, Hefezellen, wie bestimmte Stämme von *Saccharomyces cerevisiae*, Insektenzellen, tierische Zellen, wie COS-7, Vero, CHO-Zellen, Mäuse-Myelomzellen, humane FL-Zellen u.s.w.

Die Zellen können auch in Form von zellwandlosen "ghost"-Formen der Hefen, die im vorliegenden Kontext von dem Begriff "Zellen" ebenfalls umfaßt werden, bereitgestellt werden.

Ein wesentliches Merkmal der erfindungsgemäßen Zellen besteht darin, daß bei fehlender Bindung von Ligand an den Ligan-

denbindungsabschnitt des zellulären Membranrezeptors das Effektorprotein oder -polypeptid nicht in der Lage ist, die Aktivierung des speziellen Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs in den Zellen zu bewirken.

In einer bevorzugten Ausführungsform dieser Erfindung ist die erfindungsgemäße Zelle dadurch gekennzeichnet, daß in Abwesenheit von Fusionsprotein zumindest unter bestimmten Bedingungen ein Ras- oder Ras-ähnlicher Signalweg in der Zelle nicht aktiviert werden kann, und insbesondere der Signalweg, zu dessen Aktivierung das Effektorprotein oder -polypeptid in der Lage ist. So sind im Stand der Technik Zellen bekannt, bei denen ein bestimmter ras-Signaltransduktionsweg temperaturabhängig aktiv bzw. inaktiv ist. Derartige Zellen können als Ausgangszellen für eine Expression des erfindungsgemäßen Fusionsproteins eingesetzt werden.

Die zumindest unter bestimmten Bedingungen vorliegende Inaktivierung eines ras-Signaltransduktionswegs resultiert aus einem zumindest unter den bestimmten Bedingungen nicht funktionsfähigen Ras-Protein und/oder Guaninnukleotid-Austauschfaktor. Die Inaktivierung kann auf Genmutation oder vollständiger oder teilweiser Gendeletion beruhen. Beispielsweise kann ein zelleigenes Ras-Protein inaktiviert werden, wenn dessen Membranlokalisierungssignal, in der Regel ein Farnesylierungssignal, deletiert wird. Gleiche Wirkung hätte eine Mutation in diesem Membranlokalisierungssignal, welche bewirkt, daß keine Bindung des Ras-Proteins an zelluläre Membranen mehr erfolgen kann. Ein Beispiel für eine Zelle mit einem temperaturabhängig defekten Guaninnukleotid-Austauschfaktor ist der *Saccharomyces cerevisiae*-Hefestamm cdc25-2 (Broder et al., 1998). Bei diesem Stamm ist der Guaninnukleotid-Austauschfaktor bei einer restriktiven Temperatur von 33 bis 37°C, typischerweise 36°C, nicht mehr aktiv, jedoch bei einer Temperatur von beispielsweise 25°C voll funktionsfähig. Da der Guaninnukleotid-Austauschfaktor in diesem Hefestamm mit einem Ras-Protein zusammenwirkt, das einen auf den Zellzyklus einwirkenden und daher für das Zellwachstum essenziellen ras-Signal-transduktionsweg steuert, ist bei einer re-

striktiven Temperatur keine Vermehrung der Zellen des Hefestamms mehr festzustellen.

Beruhet die Inaktivierung oder Inaktivierbarkeit des zelleigenen ras-Signaltransduktionswegs auf einem Defekt oder Fehlen eines Guaninnukleotid-Austauschfaktors, so kann in dem bevorzugten Falle, wo das Effektorprotein oder -polypeptid eben diesen ras-Signaltransduktionsweg aktivieren kann, dieses Effektorprotein oder -polypeptid die Aktivität eines funktionellen Guaninnukleotid-Austauschfaktors oder eines aktiven, insbesondere konstitutiv aktiven Ras-Proteins aufweisen, welcher bzw. welches den inaktiven ras-Signaltransduktionsweg aktivieren kann. Wird ein Effektorprotein oder -polypeptid mit einer Aktivität eines nicht konstitutiv aktiven Ras-Proteins eingesetzt, so wird es sinnvollerweise die folgenden Eigenschaften aufweisen:

- es benötigt eine Aktivierung durch einen andersartigen Guaninnukleotid-Austauschfaktor, der mit dem zelleigenen Ras-Protein des inaktiven ras-Signaltransduktionsweg nicht funktional wechselwirken kann. Gegebenenfalls kann dieser spezifisch geeignete Guaninnukleotid-Austauschfaktor als heterologer Faktor in der erfindungsgemäßen Zelle oder Assay-Zelle koexprimiert werden.

Ist die Inaktivierung oder Inaktivierbarkeit des zelleigenen ras-Signalwegs auf einen Defekt oder ein Fehlen eines zelleigenen Ras-Proteins zurückzuführen, so wird in dem bevorzugten Falle, wo das Effektorprotein oder -polypeptid eben diesen ras-Signalweg aktivieren kann, dieses die Aktivität eines aktiven, insbesondere konstitutiv aktiven Ras-Proteins aufweisen. Weist das Effektorprotein oder -polypeptid die Aktivität eines nicht-konstitutiv aktiven Ras-Proteins auf, so erfolgt deren Aktivierung bevorzugt durch einen zelleigenen Guaninnukleotid-Austauschfaktor, kann jedoch alternativ hierzu auch einen in der Zelle koexprimierenden heterologen Guaninnukleotid-Austauschfaktor benötigen.

Die für die Herstellung der erfindungsgemäßen Zellen erforderlichen molekularbiologischen Techniken, z.B. Klonierung, Vektorkonstruktion, Transformation oder Transfektion, Selektionierung transformierter bzw. transfizierter Zellen und Züchtung der



transformierten bzw. transfizierten Zellen u.s.w., sind dem Fachmann wohlbekannt und es existieren viele allgemeine Protokolle dafür, die gegebenenfalls allenfalls geringfügig angepaßt werden müssen, siehe z.B. Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989), a.a.O.; Current Protocols in Molecular Biology (1991) sowie zahlreiche Protokolle, die speziell für einen bestimmten Zelltyp erstellt wurden. Die Expression von beispielsweise heterologen Proteinen und Fusionsproteinen kann dabei ausgehend von einem innerhalb eines Plasmides enthaltenen, extrachromosomal vorliegenden Gen wie auch ausgehend von einem in das Genom der Ausgangszelle integrierten Gen erfolgen. Für die Erzeugung von Zellen, bei denen ein bestimmter ras-Signaltransduktionsweg auf Ebene des Ras-Proteins und/oder eines Guaninnukleotid-Austauschfaktors inaktiviert ist, und insbesondere zur gezielten Geninaktivierung, welche auch in anderem Zusammenhang bei bestimmten Assay-Konstellationen erforderlich werden kann, stehen dem Fachmann diverse Techniken, beispielsweise durch "antisense"-Strategien, oder zur gezielten Einführung von Mutationen oder Deletionen in die jeweiligen Gene bzw. zugehörigen Genomabschnitte zur Verfügung. Insbesondere gibt es diverse bekannte Möglichkeiten zur Herstellung von Zellmutanten, in denen die Transkription der Gene z.B. für das Ras-Protein oder einen Guaninnukleotid-Austauschfaktor gezielt unter bestimmten Bedingungen, z.B. temperaturabhängig, inaktiviert werden kann. Hierzu enthalten diese Zellen diese Gene insbesondere in Verknüpfung mit Promotoren, die unter bestimmten Bedingungen, wie ab einer bestimmten Temperatur, inaktiv werden.

In einer besonderen Ausführungsform der Erfindung sind die erfindungsgemäßen Zellen und Assayzellen auf einem festen Träger aufgebracht. Als geeignete Trägersubstanzen sind im Stand der Technik insbesondere Polysaccharide, z.B. Agarose, spezielle Kunststoffe, wie Polyacrylamide, Polystyrol, Polyvinylalkohol, Silikone, oder auch bestimmte Glasqualitäten bekannt. Der Träger kann hier in Form diskreter Teilchen, z.B. Kügelchen, oder als im wesentlichen plattenförmiges Substrat, z.B. in Form einer Mikrotiterplatte, vorliegen. Der Bedeckung des Trägers mit den Zellen kann vollständig sein, wie dies in der Regel z.B. bei

Trägerkügelchen der Fall ist, oder auch nur auf Teilen oder Abschnitten desselben vorliegen, wie z.B. nur in den Vertiefungen einer Mikrotiterplatte. In einer bevorzugten Ausführungsform sind die erfindungsgemäßen Zellen auf sogenannten Biochips immobilisiert (Wolf et al. 1997 und 1998). Auf festen Träger und insbesondere Biochips immobilisiert, werden die Zellen in dieser Form vor allem in High-Throughput-Verfahren zum Nachweisen und Messen von Membranrezeptor-Liganden-Interaktionen eingesetzt. Methoden zur Immobilisierung der Zellen auf diesen Trägern sind dem Fachmann bekannt. In Abhängigkeit von dem gewählten Trägertyp ist es möglich, daß die Zellen ohne weitere Maßnahmen an den Träger binden. In diesem Falle wird die feste Trägerphase mit einer im wesentlichen homogenen Population von Zellen inkubiert, wobei diese sich in der Folge an die feste Phase anheften. Alternativ kann die Immobilisierung beispielsweise auch mittels chemischer Reagenzien, wie Glutaraldehyd, Formalin u.s.w., erfolgen. Derartige Maßnahmen sind dem Fachmann bekannt.

Die erfindungsgemäßen Zellen und Fusionsproteine sind die Grundlage einer Reihe von *in vivo*-Assayverfahren, die ebenfalls Gegenstand dieser Erfindung sind.

Die im folgenden näher erläuterten Assayverfahren können u.a. dazu genutzt werden,

1. die Eignung einer Testsubstanz als Ligand für einen Rezeptor zu bestimmen, und in diesem Falle insbesondere Massenscreens mit Ligandenderivaten durchzuführen, um zu testen, welche Derivate in der Lage sind, an den wildtypischen Ligandenbindungsabschnitt des Rezeptors zu binden,
2. die Anwesenheit eines bestimmten Liganden in einer Probe zu detektieren,
3. die Konzentration eines solchen Liganden in einer Probe zu bestimmen,
4. nachzuweisen, ob eine Verbindung in der Lage ist, eine Bindungsaktivität eines Ligandenbindungsabschnitts eines Rezeptors gegenüber einem Liganden zu verändern, also als Agonist, Antagonist oder Inhibitor zu wirken, und in diesem Falle insbesondere Massenscreens zum Auffinden solcher Ago-

- nisten- oder Antagonistenverbindungen auszuführen; und
5. die Ligandenbindungsfunktion eines Polypeptids oder Proteins, bei denen eine solche Funktion vermutet wird, für Liganden bestimmter Rezeptoren nachzuweisen; bei den Polypeptiden oder Proteinen kann es sich insbesondere um durch Mutation von natürlichen Rezeptoren abgeleitete neuartige Ligandenbindungsabschnitte von Rezeptoren handeln, deren Ligandenbindungsfunktion noch bestätigt werden muß; in diesem Zusammenhang können insbesondere Massenscreens mit derartigen neuartigen, mutierten Ligandenbindungsabschnitten, die beispielsweise in Form einer Rezeptormutantenbibliothek, die insbesondere Rezeptormutanten mit zufallsbedingt lokalisierten Mutationen im Ligandenbindungsabschnitt enthält, durchgeführt werden, um neue künstliche, funktionelle Liganden-Rezeptor-Partner zu finden.

Ein erster Assay dient der Bestimmung der Eignung einer Testsubstanz als Ligand für einen Rezeptor- oder, synonym, Ligandenbindungsabschnitt eines Rezeptors und umfaßt die folgenden Schritte:

(a) Inkontaktbringen der Testsubstanz mit erfindungsgemäßen Zellen unter Bedingungen, bei denen bei Fehlen des Membranrezeptors ein Ras- oder Ras-ähnlicher Signalweg in den Zellen nicht aktiviert werden kann, wobei der in den Zellen enthaltene Membranrezeptor den genannten Ligandenbindungsabschnitt enthält und das Effektorprotein oder -polypeptid, dessen Bindung an eine Membrankomponente von der Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors abhängig ist, in der Lage ist, den inaktiven Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg zu aktivieren,

(b) Untersuchen, ob eine Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs erfolgt ist.

Ein Nachweis der Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs zeigt dabei die Bindungsfähigkeit der Testsubstanz an den Ligandenbindungsabschnitt an.

Ein weiterer *in vivo*-Assay ermöglicht den Nachweis der Anwesenheit eines Liganden für einen Ligandenbindungsabschnitt eines

Rezeptors in einer Probe, die diesen möglicherweise enthält, und ist durch die folgenden Schritte gekennzeichnet:

- (a) Inkontaktbringen der Probe mit erfindungsgemäßen Zellen unter Bedingungen, bei denen bei Fehlen des Membranrezeptors ein Ras- oder Ras-ähnlicher Signalweg in der Zelle nicht aktiviert werden kann, wobei der in den Zellen enthaltene Membranrezeptor den genannten Ligandenbindungsabschnitt enthält und das Effektorprotein oder -polypeptid, dessen Bindung an eine Membrankomponente von der Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors abhängig ist, in der Lage ist, den inaktiven Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg zu aktivieren,
- (b) Untersuchen, ob eine Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs erfolgt ist.

Analog zu dem erstgenannten Assay zeigt ein Nachweis der Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs die Anwesenheit eines Liganden für den Ligandenbindungsabschnitt eines Rezeptors in der Probe an.

Als bevorzugte Ras- oder Ras-ähnliche Signalwege, im Folgenden alternativ auch nur als Ras-Signalwege bezeichnet, werden in diesem Zusammenhang, wie erläutert, Signalwege angesehen, die auf den Zellzyklus einwirken und deren Aktivierung für die Zellvermehrung essenziell ist. Alternative und ebenso bevorzugte ras-Signalwege dienen der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren für Gene, die für die Zellvermehrung nicht essenziell sein müssen.

Der Nachweis der Ras-Signalwegsaktivierung erfolgt bei den erfindungsgemäßen Assays somit bevorzugt indirekt, d.h. über phänotypische Änderungen, hier insbesondere Zellvermehrung oder Gen- bzw. Reportergenaktivität, in den Zellen.

Werden dementsprechend für die Assays Zellen eingesetzt, bei denen der inaktive Ras- oder Ras-ähnliche ein Signalweg ist, der auf den Zellzyklus einwirkt und dessen Aktivierung für die Zellvermehrung essenziell ist, umfassen die vorstehend erläuterten Schritte (b), zu untersuchen, ob die Zellen unter den genannten Bedingungen vermehrungsfähig sind, wobei ein Nachweis der Vermehrungsfähigkeit der Zellen die Bindungsfähigkeit der Testsub-

stanz an bzw. die Anwesenheit eines Liganden für den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors in der Probe anzeigt.

Setzt man für die Assays alternativ Zellen ein, bei denen der inaktive Ras- oder Ras-ähnliche Signalweg ein Signalweg ist, der auf die Aktivität eines Transkriptionsfaktors für ein Gen, das für die Zellvermehrung nicht notwendigerweise essenziell ist, einwirkt, so kann bei gleichzeitigem Vorliegen eines Konstrukts, umfassend eine Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor, einen damit zusammenwirkenden Minimalpromotor und ein unter Kontrolle des Minimalpromotors stehendes Gen für ein Reporterprotein, der Nachweis einer Expression des Reportergens durch Detektion des Transkriptions- oder Translationsprodukts von diesem für die Feststellung der Aktivierung des ras-Signaltransduktionswegs und damit einer erfolgten Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors herangezogen werden. Denn nur bei Aktivierung des ras-Signaltransduktionsweges kann es zu einer Aktivierung des genannten Transkriptionsfaktors kommen, welcher in der Folge über die Bindung an seine Bindungsstelle den Minimalpromotor aktivieren kann und damit die Expression des Reportergens ermöglicht.

In einer bevorzugten Ausführungsform handelt es sich bei dem Reporter-gen bzw. -protein um ein bezüglich der Assayzelle heterologes Gen bzw. Protein, dessen Anwesenheit spezifisch nur dann nachgewiesen werden kann, wenn die Expression des synthetischen Promotor-Reporter-gen-Konstrukts aufgrund der Aktivierung des spezifischen ras-Signalweges und der infolge auftretenden Aktivierung des spezifischen Transkriptionsfaktors erfolgt. Erfolgt der Nachweis nicht als direkter Nachweis des Transkriptions- oder Translationsprodukts mittels dafür spezifischer Nukleinsäuresonden oder Antikörper, sondern z.B. über die enzymatische Aktivität des Translationsprodukts, muß bei einer Verwendung von Enzyme kodierenden Genen vorab sichergestellt werden, daß die verwendete Assayzelle vor der Transformation oder Transfektion mit dem synthetischen Promotor-Reporter-gen-Konstrukt eine enzymatische Aktivität, wie sie das bei Ligandenbindung exprimierte heterologe Enzym ausübt, nicht enthält. Entsprechendes gilt für die anderen Reporterproteintypen.

Alternativ kann als Reportergen auch ein bezüglich der Assayzelle homologes Gen eingesetzt werden. Eine Reportergenexpression infolge der Aktivierung eines Transkriptionsfaktors, die nur aufgrund der im Assay nachzuweisenden Aktivierung eines Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweges in den Zellen erfolgt, wird in diesem Falle zu einer Erhöhung der in den Zellen vorliegenden Mengen an Transkriptionsprodukt des Reportergens und gegebenenfalls auch einer erhöhten Menge an Translationsprodukt des Reportergens führen, welche anhand von Vergleichsversuchen ohne Einsatz von Ligand, z.B. mittels Northern-Blotting oder Western-Blotting, ermittelt werden können.

Bei Wahl dieser beiden letztgenannten Alternativen ist die Kenntnis des jeweiligen durch den gewählten ras-Signaltransduktionsweg aktivierten Transkriptionsfaktors sowie des mit diesem Transkriptionsfaktor zusammenwirkenden Promotorabschnitts bzw. von dessen Sequenz erforderlich. Um diese Assayvariante zu ermöglichen, wird die Assayzelle mit einem Konstrukt, umfassend den Promotor in funktionaler Verknüpfung mit dem Reportergen, transformiert bzw. transfiziert, was gegebenenfalls im Wege der Cotransformation oder Cotransfektion zusammen mit einem oder mehreren Konstrukt(en), die Gene für weitere Komponenten des Assaysystems, z.B. den Membranrezeptor, enthalten, erfolgen kann.

Gegenwärtig sind bereits eine Reihe von ras-Signaltransduktionswegen z.B. in unterschiedlichen eukaryotischen Organismen vollständig auch bezüglich der dadurch aktivierten Transkriptionsfaktoren und den damit zusammenwirkenden Promotorbereichen erforscht. Somit steht dem Fachmann für eine diesbezügliche Auswahl eine Reihe von Möglichkeiten zur Verfügung.

Die für die Herstellung von Transformations- oder Expressionsvektoren, die das Reportergen in funktionaler Verknüpfung mit einem geeigneten spezifischen Promotor enthalten, sowie die Transformation oder Transfektion von Zellen erforderlichen molekularbiologischen Techniken, z.B. Klonierung, Vektorkonstruktion u.s.w., sind dem Fachmann wohlbekannt und es existieren zahlreiche allgemeine Protokolle dafür, die gegebenenfalls allenfalls einer geringfügigen Anpassung bedürfen (siehe z.B. Sambrook, J.,

Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989), a.a.O.; Current Protocols in Molecular Biology (1991)).

Als hier einsetzbare Reportergene sind dem Fachmann zahlreiche Gene bekannt, die Proteine kodieren, die einem einfachen und schnellen Nachweis zugänglich sind. Beispiele hierfür sind Gene, die enzymatisch aktive Proteine, z.B.  $\beta$ -Galactosidase, fluoreszierende Proteine, z.B. GFP ("green fluorescence protein") oder chemolumineszierende Proteine kodieren. Eine weitere Möglichkeit besteht in Genen, die Proteine kodieren, die mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen werden können. Hierbei trägt dann der Antikörper eine nachweisbare Markierung oder kann seinerseits durch einen sekundären, markierten Antikörper nachgewiesen werden. Derartige Möglichkeiten sind im Stand der Technik wohlbekannt. Wie bereits vorstehend erläutert, ist neben dem Erfordernis der Nachweisbarkeit allein essenziell, daß das in der Zelle nachzuweisende Ereignis, z.B. enzymatische Aktivität, Antikörperbindung, Fluoreszenz, Chemolumineszenz, in Abwesenheit des Konstrukts mit dem Gen für das Reporterprotein nicht nachweisbar ist.

Alternativ kann die Transkription des Reportergens anhand der gebildeten mRNA mittels dafür spezifischer Sonden durch Northern-Blotting nachgewiesen werden.

Ein weiterer *in vivo*-Assay erlaubt die quantitative Bestimmung der Konzentration eines Liganden für einen Ligandenbindungsabschnitt eines Rezeptors in einer Probe, die diesen enthält, gekennzeichnet durch die folgenden Schritte:

(a) Inkontaktbringen eines Aliquots der Probe mit erfindungsgemäßen Zellen unter Bedingungen, bei denen bei Fehlen des Membranrezeptors ein Ras- oder Ras-ähnlicher Signalweg in der Zelle nicht aktiviert werden kann, wobei der Membranrezeptor den genannten Ligandenbindungsabschnitt enthält und das Effektorprotein oder -polypeptid, dessen Bindung an eine Membrankomponente von der Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors, wie in Anspruch 1 definiert, abhängig ist, in der Lage ist, den inaktiven Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg zu aktivieren,

(b) quantitatives Nachweisen des Ausmaßes der Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweges auf direktem oder indirektem Weg,

(c) Ermittlung der Konzentration des Liganden in der Probe durch Vergleich des ermittelten Aktivierungsausmaßes mit entsprechenden Werten, die für bekannte Standardkonzentrationen des Liganden ermittelt wurden.

Verwendet man für den quantitativen Nachweis des Schrittes (b) Zellen, bei denen der zumindest unter bestimmten Bedingungen inaktive ras-Signaltransduktionsweg ein Signalweg ist, der auf den Zellzyklus einwirkt und dessen Aktivierung für die Zellvermehrung essenziell ist, erfolgt dieser auf einfache Weise, indem die Vermehrung der Zellen zu einem festgelegten Zeitpunkt oder die Vermehrungsrate der Zellen unter den genannten Bedingungen bestimmt wird. Die erhaltenen Daten werden dann mit anhand von Standardpräparationen bekannter Konzentration erhaltenen Daten verglichen und die Konzentration der Probe rechnerisch ermittelt.

Alternativ kann auch hier der quantitative Nachweis des Ausmaßes der ras-Signalwegsaktivierung anhand des Ausmaßes der Expression eines bevorzugt zu der Zelle heterologen Reportergens in der Zelle erfolgen. Wie vorstehend erläutert, kann dessen Expression nur aufgrund der infolge der Aktivierung des sich an ein Ras-Protein anschließenden Signalwegs bewirkten Aktivierung eines spezifischen Transkriptionsfaktors erfolgen. Bevorzugt erfolgt der Assay bei dieser Nachweisvariante unter Bedingungen, die eine Zellvermehrung ausschließen, beispielsweise durch Verwendung der cdc25-2-Hefemutante bei restriktiven Temperaturen, so daß die transkribierte Menge an Transkriptionsprodukt des Reportergens oder die exprimierte Menge an Reporterprotein zu einem bestimmten Zeitpunkt oder alternativ die Expressionsrate dieses Reportergens bzw. -proteins bei im wesentlichen gleichbleibender Zellzahl bestimmt werden kann. Jedoch kann die quantitative Bestimmung auch unter Proliferationsbedingungen erfolgen, wenn gleichzeitig fortlaufend oder in bestimmten Zeitabständen die Zellzahl bestimmt wird und die ermittelten Werte für



die Reportergenexpression in Werte pro Einheitswert der Zellzahl umgerechnet werden.

Alternativ kann auch hier ein quantitativer Nachweis über die Expression eines zu der Wirtszelle homologen Reportergens erfolgen, wobei hier die jeweils beobachtbare Zunahme der Expression des Reportergens gegenüber dem in Zellen ohne Aktivierung des ras-Signalwegs vorliegenden Expressionsniveau für die Ermittlung des Ergebnisses oder Werts aus jedem Einzeltest, der dann zur Ermittlung des Gesamtergebnisses, der Ligandenkonzentration, mit den Werten der übrigen Tests verglichen wird, herangezogen wird.

Ein weiterer alternativer *in vivo*-Assay ermöglicht den Nachweis, ob eine Verbindung in der Lage ist, eine Bindungsaktivität eines Ligandenbindungsabschnitts eines Rezeptors gegenüber einem Liganden zu verändern, also als Agonist, Antagonist oder Inhibitor zu wirken. Dieser Assay ist durch die folgenden Schritte gekennzeichnet:

- (a) Inkontaktbringen des Liganden in Anwesenheit der Verbindung mit erfindungsgemäßen Zellen unter Bedingungen, bei denen bei Fehlen des Membranrezeptors ein Ras- oder Ras-ähnlicher Signalweg in den Zellen nicht aktiviert werden kann, wobei der Membranrezeptor den genannten Ligandenbindungsabschnitt enthält und das Effektorprotein oder -polypeptid, dessen Bindung an eine Membrankomponente von der Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors definiert, abhängig ist, in der Lage ist, den inaktiven Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg zu aktivieren,
- (b) Untersuchen, ob und gegebenenfalls in welchem Ausmaß eine Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweges erfolgt ist,
- (c) Vergleichen des Untersuchungsergebnisses von Schritt (b) mit einem Untersuchungsergebnis, das bei Ausführen des Assay in Abwesenheit der Verbindung erhalten wird.

Dabei zeigt eine verstärkte Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signaltransduktionsweges in Anwesenheit der Verbindung eine Agonistenfunktion dieser Verbindung, eine verringerte oder gegebenenfalls auch vollständig fehlende Aktivierung dagegen eine Antagonisten- oder Inhibitorfunktion der Verbindung an.

Schritt (a) kann dabei umfassen, die Verbindung vor dem Liganden den Zellen zuzusetzen, wobei gegebenenfalls eine Vorinkubation der Verbindung mit den Zellen vorgenommen werden kann, die Verbindung separat, aber gleichzeitig mit dem Liganden den Assayzellen zuzusetzen oder die Verbindung vorab mit dem Liganden zu mischen und gegebenenfalls eine Vorinkubation der beiden Verbindungen durchzuführen und erst dann die Mischung den Assayzellen zuzusetzen.

Handelt es sich bei der Verbindung um ein Peptid, Polypeptid oder Protein, so kann die Verbindung auch durch Expression eines dafür kodierenden Gens innerhalb der Zelle selbst hergestellt werden. Zu diesem Zweck können die Zellen mit einem Expressionsvektor, der ein solches Gen enthält, transformiert oder transfiert werden. Die hierfür erforderlichen Mittel und Methoden sind dem Fachmann wohlbekannt.

Wird die auf ihre Agonisten- oder Antagonistenwirkung zu testende Verbindung in der Assayzelle exprimiert, so erfolgt die Expression des dafür kodierenden Gens vorzugsweise unter Kontrolle eines konstitutiv aktiven Promotors sowie unter Verwendung von Zellen, in denen der Ras- oder Ras-ähnliche Signaltransduktionsweg nur unter den speziellen Assaybedingungen inaktiviert wird. Ein solches System ermöglicht es, auszuschließen, daß allein die Expression der Verbindung in der Zelle Veränderungen hervorruft, die das Ergebnis des Assay verfälschen können. Für diesen Ausschluß ist erforderlich, die Aktivität des unter restriktiven Bedingungen inaktivierten zelleigenen ras-Signaltransduktionsweges unter nicht-restriktiven Bedingungen und in Abwesenheit von Ligand nachzuweisen. Wird unter nicht-restriktiven Bedingungen und in Abwesenheit von Ligand gearbeitet, liegt der Membranrezeptor in einem inaktiven Zustand vor, so daß die nachweisbare Aktivierung des ras-Signaltransduktionsweges anzeigt, daß das Expressionsprodukt mit keiner Komponente des Ras- oder Ras-ähnlichen Signaltransduktionswegs, und insbesondere nicht mit dem dafür spezifischen Ras-Protein oder Guannukleotid-Austauschfaktor, interferiert. Auf diese Weise kann ausgeschlossen oder die Wahrscheinlichkeit minimiert werden, daß das Expressionsprodukt anstatt mit dem Ligandenbindungsabschnitt

des Membranrezeptors mit dem Effektorprotein oder einem für die Bindung des Effektorproteins an die Membrankomponente erforderlichen Adaptorprotein wechselwirkt, so daß deren Fähigkeit zur Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signaltransduktionsweges beseitigt wird.

Ein entsprechender Test auf Aktivierung des jeweiligen Ras- oder Ras-ähnlichen Signaltransduktionswegs unter nicht-restriktiven Bedingungen, in Anwesenheit der Verbindung und in Abwesenheit von Ligand wird analog bei einer Verbindung, die den Assayzellen von außen zugesetzt wird, vorgenommen.

Handelt es sich bei dem unter den Assaybedingungen inaktivierbaren Ras- oder Ras-ähnlichen Signaltransduktionsweg um einen, dessen Aktivierung für die Zellvermehrung essenziell ist, so wird unter nicht-restriktiven Bedingungen einfach die normale Vermehrbarkeit der Zellen sichergestellt. Erfolgt der Nachweis unter Nutzung einer Reportergenaktivität, so ist ein Nachweis dieser Reportergenaktivität unter nicht-restriktiven Bedingungen erforderlich.

Für den Nachweis unter den restriktiven Bedingungen des Assay in Schritt (b) besteht ebenfalls beispielsweise die Möglichkeit, die Aktivierung des sich an ein Ras-Protein anschließenden Signalweges über die gegebenenfalls erfolgende Expression eines zu den Zellen heterologen Reportergens, die nur aufgrund der infolge der Aktivierung des sich an ein Ras-Protein anschließenden Signalweges erfolgenden Aktivierung eines spezifischen Transkriptionsfaktors erfolgt, nachzuweisen. Der bei Nachweis von Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweges erfolgende Nachweis des Ausmaßes dieser Aktivierung, kann eine quantitative Bestimmung umfassen, bei welcher die in den Zellen vorliegende Menge an Transkriptions- oder Translationsprodukt (Reporterprotein) des Reportergens zu einem bestimmten Zeitpunkt oder die Transkriptionsrate des Reportergens oder die Expressionsrate des Reporterproteins unter den genannten Bedingungen bestimmt wird.

Alternativ kann auch nur eine Analyse von Aliquots, d.h. gleichen Volumina der bis auf den Zusatz der Verbindung identisch erzeugten und behandelten Assaylösungen, bevorzugt unter Sicherstellen gleicher oder im wesentlichen gleicher Zellzahlen

in diesen Aliquots, vorgenommen werden. In diesem Falle erfolgt keine absolute Quantifizierung des Expressionsniveaus des Reportergens, sondern es wird nur ein relativer Vergleich der Expressionsniveaus in beiden Assays ermöglicht.

In dem Falle, wo der Vergleich in Schritt (c) ergibt, daß in Anwesenheit der Verbindung eine stärkere Expression des Reportergens auftritt, ist eine Agonistenwirkung der Verbindung und in dem Falle, wo der Vergleich in Schritt (c) ergibt, daß in Anwesenheit der Verbindung eine geringere Expression des Reportergens auftritt, eine Antagonistenwirkung der Verbindung anzunehmen. Wie der vorstehend beschriebene quantitative Assay wird auch dieser Assay bevorzugt unter Bedingungen durchgeführt wird, bei denen keine Vermehrung der Zellen auftritt.

Alternativ kann das für den Nachweis eingesetzte Reportergen auch hier zu der Assayzelle homolog sein, wobei hier die jeweils beobachtbare Zunahme der Expression, d.h. Transkription und/oder Translation, des Reportergens gegenüber dem in Zellen ohne Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs vorliegenden Expressionsniveau für die Ermittlung des Ergebnisses herangezogen wird.

Werden für den Assay Zellen eingesetzt, bei denen der inaktive, sich an ein Ras-Protein anschließende Signalweg ein Signalweg ist, der auf den Zellzyklus einwirkt und dessen Aktivierung für die Zellvermehrung essenziell ist, umfaßt Schritt (b), zu untersuchen, ob und gegebenenfalls in welchem Ausmaß die Zellen unter den genannten Bedingungen vermehrungsfähig sind. In dem Falle, wo der Vergleich in Schritt (c) ergibt, daß in Anwesenheit der Verbindung eine stärkere Zellvermehrung auftritt, ist auf eine Agonistenwirkung der Verbindung und in dem Falle, wo der Vergleich in Schritt (c) ergibt, daß in Anwesenheit der Verbindung eine geringere Zellvermehrung auftritt, auf eine Antagonistenwirkung der Verbindung zu schließen.

Wie sämtliche Assays im Rahmen dieser Erfindung eignet sich auch dieser Assay insbesondere für ein Massenscreening, hier auf Agonisten- und Antagonistenverbindungen für Rezeptoren.

Alternativ kann der Assay auch als zusätzlicher Test zur Bestätigung der Ligandenbindungseigenschaft eines neuen, insbeson-

dere synthetischen Ligandenbindungsabschnitts oder zur Bestätigung der Eignung einer Testsubstanz als Ligand für den Ligandenbindungsabschnitt herangezogen werden. Liegt eine Ligandenbindungseigenschaft des Ligandenbindungsabschnitts vor bzw. besteht eine Eignung als Ligand für den Ligandenbindungsabschnitt, so müßte bei Verwendung eines bekannten Agonisten für den zum ersten Nachweis der Ligandeneigenschaft eingesetzten Liganden bzw. für den Ligandenbindungsabschnitt eine verstärkte Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweges beobachtet werden, und bei Verwendung eines bekannten Antagonisten für den Liganden bzw. den Ligandenbindungsabschnitt im Gegenzug eine verringerte Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweges.

Ein weiterer alternativer *in vivo*-Assay ermöglicht den Nachweis, ob ein Polypeptid oder Protein, bei dem eine Ligandenbindungsfunktion eines Rezeptors vermutet wird, diese auch tatsächlich aufweist. Dieser Assay umfaßt die folgenden Schritte:

- (a) Inkontaktbringen von erfindungsgemäßen Zellen mit dem Liganden unter Bedingungen, bei denen bei Fehlen des Membranrezeptors ein Ras- oder Ras-ähnlicher Signalweg in den Zellen nicht aktiviert werden kann, wobei der Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors das zu untersuchende Polypeptid oder Protein umfaßt oder daraus besteht und wobei das Effektorprotein oder -polypeptid, dessen Bindung an eine Membrankomponente von der Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors abhängig ist, in der Lage ist, den inaktiven Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg zu aktivieren,
- (b) Untersuchen, ob eine Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs erfolgt ist.

Ein Nachweis der Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweges zeigt an, daß der Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors und dementsprechend das zu untersuchende Polypeptid oder Protein eine Ligandenbindungsfunktion eines Rezeptors aufweist.

Beispielsweise kann der in den Zellen enthaltene Membranrezeptor einen Ligandenbindungsabschnitt umfassen, der einen von einem Ligandenbindungsabschnitt eines natürlich vorkommenden Rezeptors durch Mutation abgeleiteten Ligandenbindungsabschnitt enthält oder daraus besteht.

Wie zuvor, kann die Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signaltransduktionsweges bei Verwendung von Zellen, bei denen der zumindest unter bestimmten Bedingungen inaktive Ras- oder Ras-ähnliche Signaltransduktionsweg ein Signalweg ist, der auf den Zellzyklus einwirkt und dessen Aktivierung für die Zellvermehrung essenziell ist, anhand einer gegebenenfalls erfolgenden Zellvermehrung nachgewiesen werden.

Alternativ kann der Nachweis der Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signaltransduktionsweges auch anhand der gegebenenfalls feststellbaren Expression eines Reportergens in den Zellen erfolgen. Wie erläutert, erfolgt dessen Expression, wenn es sich um ein heterologes Reportergen handelt, nur aufgrund der infolge der Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweges erfolgenden Aktivierung eines spezifischen Transkriptionsfaktors. Im Falle eines homologen Reportergens wird auf den Nachweis der Erhöhung der Reportergenexpression, z.B. aufgrund höherer Mengen an Transkriptions- oder Translationsprodukt, im Vergleich zu dem Expressionsniveau ohne Aktivierung des spezifischen Ras-Signaltransduktionswegs abgestellt.

Die Detektion von Rezeptor-Liganden-Interaktionen mittels der erfindungsgemäßen Assayverfahren, Zellen und Fusionsproteine ist nicht auf eukaryotische Zellen als *in vivo*-Testsystem beschränkt, sondern kann wahlweise auch in prokaryotischen Zellen oder auch in zellwandlosen Hefen, sogenannten "ghost"-Formen von Hefen erfolgen.

Je nach eingesetztem Membranrezeptor und insbesondere je nach dem durch den Mediatorabschnitt des Membranrezeptors bedingten Mechanismus, der schließlich zu einer Translokation des Effektorproteins oder -polypeptids an die Membran führt, kann es bei einigen Ausführungsformen der Erfindung, wie bereits weiter oben angesprochen, zusätzlich erforderlich werden, in der Assayzelle weitere Voraussetzungen vorzusehen, die sicherstellen, daß das nachweisbare Translokationsereignis ausschließlich bei Wechselwirkung eines Liganden mit dem Ligandenbindungsabschnitt dieses Membranrezeptors auftritt. Eine Assoziierung des Effektorproteins oder -polypeptids mit membranständigen Zellkomponenten,

die (in Abwesenheit des Membranrezeptors und der mit diesem bei der Signaltransduktion spezifisch und ausschließlich zusammenwirkenden Zellkomponenten) natürlicherweise in diesen Zellen vorkommen und zwar gleich welchen Aktivierungs- und Modifizierungszustandes, muß ausgeschlossen sein. Dies setzt voraus, daß alle Komponenten, die an der Translokation des Effektorproteins oder -polypeptids an die Zellmembran direkt und indirekt beteiligt sind, nur in Folge der Aktivierung des speziell zu testenden Membranrezeptors aufgrund der Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt, und genauer nur in Folge der durch diese Aktivierung bedingten Strukturänderung des Mediatorabschnitts in die Lage versetzt werden können, die Bindung des Effektorproteins oder -polypeptids an eine Komponente der Zellmembran zu vermitteln oder zu bewirken.

Soll in einem Test ein in einer Zelle natürlicherweise vorkommender Membranrezeptor getestet werden, muß sichergestellt werden, daß in der Zelle der Mediatorabschnitt dieses Membranrezeptors nur in Zusammenhang mit diesem vorkommt und daß die damit zusammenwirkenden Adaptor- und Vermittlerproteine nur mit diesem Mediatorabschnitt oder nur aufgrund einer Aktivierung dieses Mediatorabschnitts in einer Weise interagieren können, daß es schließlich zu einer Translokation des Effektorproteins oder -polypeptids an die Zellmembran kommt.

Alternativ kann eine Zelle als Assayzelle ausgewählt werden, in der alle diese Komponenten vor der Einschleusung der genetischen Information für den Membranrezeptor und die gegebenenfalls benötigten Adaptor-, Vermittler- und/oder Effektorproteine bzw. -polypeptide natürlicherweise nicht vorkommen, also zu dieser Ausgangszelle heterolog sind und auch keine zelleigenen Komponenten gleicher Spezifität und ggf. Aktivität, die diese ersetzen könnten, vorliegen; bezüglich des Membranrezeptors kann dies auch nur für den Mediatorabschnitt gelten. Oder es muß dafür Sorge getragen werden, daß eine Ausgangszelle, die diese Komponenten, bezüglich des Membranrezeptors ggf. auch nur den speziellen Mediatorabschnitt, in einem ursprünglichen Zustand einmal enthielt, diese Komponenten aufgrund von genetischer oder sonstiger Modifizierung vor der Einschleusung der genetischen In-

formation für den Membranrezeptor und die gegebenenfalls benötigten Adaptor-, Vermittler- und/oder Effektorproteine bzw. -polypeptide nicht mehr enthält. Zusammenfassend erläutert, betrifft dies zumindest die folgenden Komponenten:

- den Mediatorabschnitt,
- ggf. die damit zusammenwirkenden Adaptorproteine oder Adaptorproteinabschnitte, sofern eine Bindung des Effektorproteins oder -polypeptids an diese oder über diese erfolgt, sowie,
- z.B. im Falle der vorliegend erläuterten Alternative 1)c), ggf. eine Vermittlerkomponente, welche mit dem Mediatorabschnitt des Membranrezeptor räumlich nicht unmittelbar assoziiert sein muß, jedoch im Falle einer Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt von diesem aktiviert oder modifiziert wird und aufgrunddessen ein sekundäres Ereignis an einer weiteren Komponente der Zellmembran vermittelt, infolgedessen sich das Effektorprotein oder -polypeptid spezifisch an diese Komponente der Zellmembran, die mit dem Mediatorabschnitt des Membranrezeptors nicht assoziiert ist, bindet; alternativ darf das genannte sekundäre Ereignis in der Zelle nur bei Ligandenbindung des Ligandenbindungsabschnitts des Membranrezeptors vermittelt werden. Es dürfen im letzteren Falle in der Zelle also keine Wechselwirkungspartner für diese Vermittler vorliegen, die eine entsprechende Aktivierungswirkung wie der Membranrezeptor auf den oder die Vermittler ausüben können.

Verwendet man folglich ein Zellsystem, in dem der zu testende Membranrezeptor natürlicherweise nicht vorkommt, kann es erforderlich werden, neben dem Membranrezeptor weitere Proteine in diesem Zellsystem zu exprimieren, und zwar gegebenenfalls insbesondere Adaptor- und/oder Vermittlerproteine oder -polypeptide.

Bezüglich der Assaybedingungen sind keine bestimmten allgemeinen Vorgaben erforderlich. Im Falle eines Nachweises der gegebenenfalls erfolgenden Zellvermehrung ist jedoch darauf zu achten, daß das verwendete Medium eine solche grundsätzlich ermöglicht. Sofern in den Zellen Gene, wie erläutert, durch Wahl bestimmter Assaybedingungen inaktiviert werden können und im Zu-



ge des Assays auch inaktiviert werden sollen, sind diese Bedingungen, wie z.B. eine bestimmte restriktive Assaytemperatur, bei cdc25-2-Zellen z.B. 33 - 37°C, während des Assay einzuhalten. Das gewählte Reaktionsmedium sollte ferner nicht mit der Testverbindung oder dem Liganden, die diesem zugesetzt werden, auf eine Weise wechselwirken, daß der Assay beeinträchtigt wird.

Als Liganden können in sämtlichen vorstehend erläuterten Assayverfahren natürliche vorkommende Substanzen, wie Geruchsstoffe, Geschmacksstoffe, Peptide, Peptidhormone und Proteine, insbesondere Zytokine, Neurotransmitter, nicht-protein- oder -peptidartige Hormone, insbesondere Steroidhormone, Vitamine, z.B. Vitamin D, Thyroxin oder Retinsäure, wie auch in der Natur nicht vorkommende Substanzen, z.B. synthetische Derivate natürlicher Liganden oder Toxine/Giftstoffe, wie Dioxin, untersucht bzw. bestimmt werden.

In der Mehrzahl der Fälle wird der Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors extrazellulär lokalisiert sein. Bei Einsatz von Ligandenbindungsabschnitten insbesondere nukleärer Rezeptoren besteht jedoch auch die Möglichkeit, daß diese intrazellulär lokalisiert sind. Da die Liganden nukleärer Rezeptoren überwiegend kleine Moleküle mit geringer relativer Molekülmasse und von überwiegend hydrophober Natur darstellen, diffundieren diese ohne weitere Maßnahmen in die erfindungsgemäßen Assayzellen, um dort mit einem intrazellulär und unmittelbar an der Zellmembran lokalisierten Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors eine Bindung einzugehen. Sofern gewünscht und/oder erforderlich, können die Zellen jedoch vor dem Assay in geeigneter Weise vorbehandelt werden, um die äußere Zellmembran für den Durchtritt der Testverbindung oder des Liganden durchlässiger zu machen. Ein Beispiel hierfür ist die Herstellung von Zell-"ghosts" durch z.B. enzymatische Behandlung der Zellen. Derartige wie auch auf andere Weise hergestellte Zell-"ghosts" sowie Zellen mit zur Erhöhung der Permeabilität anderweitig modifizierter Zellwand werden im vorliegenden Zusammenhang von dem Begriff "Zellen" mit umfaßt.

Handelt es sich bei den zu testenden Liganden um Peptide, Polypeptide oder Proteine, so können diese auch in der Assayzel-

le ausgehend von in die Assayzelle eingeschleusten Nukleinsäurekonstrukten, die diese kodieren, exprimiert werden, allerdings in diesem Falle nicht konstitutiv, sondern unter Kontrolle eines induzierbaren Promotors. Das Inkontaktbringen der Assayzelle mit dem Liganden erfolgt dementsprechend unter den Bedingungen, bei denen die Expression des zu testenden Liganden in der Zelle induziert wird. Dem Fachmann sind zu diesem Zweck eine Vielzahl von induzierbaren Promotoren, die beispielsweise durch bestimmte Temperaturen oder chemische Verbindungen induzierbar sind, bekannt. Bei Einsatz von Membranrezeptoren mit extrazellulär lokalisierter Ligandenbindungsdomäne ist zusätzlich dafür Sorge zu tragen, daß in der Assayzelle exprimierte Liganden auch aus den Assayzellen in den Extrazellulärraum sezerniert werden. Auch hierfür sind dem Fachmann diverse Möglichkeiten bekannt.

Der Nachweis der Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signaltransduktionswegs erfolgt je nach Nachweisstrategie auf dem Fachmann geläufige Weise. Befinden sich die Zellen während des Assay immobilisiert an einem festen Träger, so kann es insbesondere bei Nachweis einer Reportergenaktivität oder eines Reporterproteins erforderlich oder hilfreich sein, die Zellen vor der Nachweisreaktion zu solubilisieren, d.h. sie von dem Träger abzulösen und ggf. auch aufzubrechen. Auch die hierfür erforderlichen Maßnahmen und Reagenzien sind dem Fachmann wohlbekannt.

Die Erfindung stellt darüber hinaus Kits zur Verwendung in den erfindungsgemäßen Assays bereit, welche es z.B. ermöglichen, schnell und effizient zu bestimmen, ob ein spezifischer Ligand in der Lage ist, an einen bestimmten Rezeptor und genauer an dessen Ligandenbindungsabschnitt zu binden.

Ein erster Kit der Erfindung zur Verwendung in den Assayverfahren zur Bestimmung der Eignung einer Testsubstanz als Ligand für einen Ligandenbindungsabschnitt eines Rezeptors, zur Bestimmung der Anwesenheit eines Liganden für einen Ligandenbindungsabschnitt eines Rezeptors in einer Probe, zur Konzentrationsbestimmung eines solchen Liganden sowie zur Charakterisierung von Verbindungen als mögliche Agonisten oder Antagonisten bezüglich Rezeptor-Liganden-Wechselwirkungen umfaßt je-

weils erfindungsgemäße Zellen mit den vorstehend bei den Assayverfahren im Einzelnen erläuterten Eigenschaften. So enthalten die Zellen des Kits beispielsweise bei einem vorgesehenen Nachweis einer Reporterogenaktivität zusätzlich ein Konstrukt mit einer Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor, der spezifisch durch den Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg, dessen Aktivierung mittels der Assays nachgewiesen werden soll, aktiviert wird, einem Minimalpromotor und dem Reporter gen. Alternativ kann der Kit wie auch alle folgenden einen Transformations- bzw. Transfektionsvektor, der das Konstrukt enthält, umfassen. Auf diese Weise kann der Verwender des Kits bei Wahl dieses Nachweisweges die im Kit enthaltenen Assayzellen durch Transformation oder Transfektion mit diesem Konstrukt ausstatten. In einer weiteren Ausführungsform dieses und aller folgenden Kits enthält der separat im Kit bereitgestellte Transformations- bzw. Transfektionsvektor nur die Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor und den damit funktional verknüpften Minimalpromotor sowie eine geeignet vorgesehene Insertionsstelle für die Insertion eines durch den Verwender frei wählbaren Reportergens.

Darüber hinaus kann dieser Kit wie auch alle folgenden unter anderem gegebenenfalls auch Assaypuffer, Reagenzien zur Detektion der phänotypischen Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signaltransduktionsweges in diesen Zellen und/oder eine Gebrauchsanweisung enthalten.

Ein alternativer Kit für die vorstehend genannten Assayverfahren umfaßt mindestens zwei der folgenden Komponenten:

- (a) Zellen, in denen zumindest unter bestimmten Bedingungen ein Ras- oder Ras-ähnlicher Signalweg nicht aktiviert werden kann;
- (b) einen Nukleinsäurevektor, in den eine DNA-Sequenz exprimierbar eingefügt ist, die einen Membranrezeptor, wie vorstehend definiert, kodiert, wobei das Effektorprotein oder -polypeptid, dessen Bindung an eine Membrankomponente von der Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors abhängig ist, in der Lage ist, den inaktiven Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg in den unter (a) genannten Zellen zu aktivieren;

(c) einen Nukleinsäurevektor, in den eine DNA-Sequenz exprimierbar eingefügt ist, die das Effektorprotein oder -polypeptid, das im Falle einer Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors an eine Komponente der Membran, gegebenenfalls über weitere Proteine oder Polypeptide, binden kann, kodiert;

(d) einen Nukleinsäurevektor, in den eine DNA-Sequenz exprimierbar eingefügt ist, die mindestens ein Adaptorprotein, über welches das Effektorprotein oder -polypeptid bei Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors an eine Komponente der Membran binden kann, kodiert.

Ein weiterer alternativer Kit für die vorstehend genannten Assays ermöglicht bei bestimmter Auswahl der nachfolgend aufgeführten Komponenten insbesondere die Herstellung der Assayzelle mit einem Membranrezeptor, der einen individuell gewünschte Ligandenbindungsabschnitt enthält. Der Kit umfaßt mindestens zwei der folgenden Komponenten:

- (a) Zellen, in denen zumindest unter bestimmten Bedingungen ein Ras- oder Ras-ähnlicher Signalweg nicht aktiviert werden kann;
- (b) einen Nukleinsäurevektor, der in geeigneter Anordnung umfaßt:

- einen DNA-Abschnitt, der ein Membranlokalisierungssignal eines Membranrezeptors, wie vorstehend in Zusammenhang mit dem Membranrezeptor definiert, kodiert;

- einen DNA-Abschnitt, der einen Mediatorabschnitt eines Membranrezeptors, wie vorstehend in Zusammenhang mit dem Membranrezeptor definiert, kodiert; und

- eine geeignet angeordnete Insertionsstelle zur funktionalen Insertion einer DNA-Sequenz, die einen Ligandenbindungsabschnitt eines Rezeptors kodiert,

wobei nach Insertion einer DNA-Sequenz für den Ligandenbindungsabschnitt der Nukleinsäurevektor ein vollständiges exprimierbares Gen für einen Membranrezeptor, wie vorstehend definiert, umfaßt, wobei das Effektorprotein oder -polypeptid, dessen Bindung an eine Membrankomponente von der Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors abhängig ist, in

der Lage ist, den inaktiven Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg in den unter (a) genannten Zellen zu aktivieren;

(c) einen Nukleinsäurevektor, in den eine DNA-Sequenz exprimierbar eingefügt ist, die das Effektorprotein oder -polypeptid, das im Falle einer Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors an eine Komponente der Membran, gegebenenfalls über weitere Proteine oder Polypeptide, binden kann, kodiert;

(d) einen Nukleinsäurevektor, in den eine DNA-Sequenz exprimierbar eingefügt ist, die mindestens ein Adaptorprotein, über welches das Effektorprotein oder -polypeptid bei Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors an eine Komponente der Membran binden kann, kodiert.

Für die beiden letztgenannten Kits gilt, daß in einer speziellen Ausführungsform die Komponente (c) des Kits einen Nukleinsäurevektor umfaßt, dessen DNA-Sequenz ein Effektorprotein oder -polypeptid in Form eines Fusionsproteins aus einem Effektorabschnitt und einem Adaptorprotein oder -polypeptid, das die Bindung an eine Komponente der Membran, gegebenenfalls über weitere Proteine oder Polypeptide, ermöglicht, kodiert.

Außerdem gilt auch für die beiden letztgenannten Assays, daß die in dem Kit enthaltenen Zellen bei einem vorgesehenen Nachweis einer Reportergenaktivität u.a. zusätzlich auch ein Konstrukt, umfassend eine Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor, dessen Aktivierung infolge der Aktivierung des speziellen Ras- oder Ras-ähnlichen Signalwegs, dessen Aktivierung durch den Assay nachgewiesen werden soll, erfolgt, einen Minimalpromotor und das Reportergen, wie vorstehend erläutert, enthalten können, oder es kann alternativ getrennt von den Zellen ein Transformations- oder Transfektionsvektor mit dem Transkriptionsfaktorbindungsstelle-Minimalpromotor-Reporter-Gen-Konstrukt oder mit einem andersartigen Konstrukt, umfassend die Transkriptionsfaktorbindungsstelle und den Minimalpromotor und darüber hinaus eine geeignet angeordnete Insertionsstelle für ein frei wählbares Reporter-Gen, vorgesehen werden.

Durch die Erfindung werden auch Kits für die erfindungsgemäßen Assayverfahren zum Nachweis, ob ein Polypeptid oder Protein eine Ligandenbindungsfunktion eines Rezeptors aufweist, bereitgestellt.

Ein hierfür geeigneter Kit umfaßt erfindungsgemäße Zellen, wobei der darin enthaltene Membranrezeptor einen Ligandenbindungsabschnitt, umfassend ein oder bestehend aus einem Polypeptid oder Protein, bei dem eine Ligandenbindungsfunktion eines Rezeptors vermutet wird, umfaßt.

Ein alternativer Assay umfaßt mindestens zwei der folgenden Komponenten:

- (a) Zellen, in denen zumindest unter bestimmten Bedingungen ein Ras- oder Ras-ähnlicher Signalweg nicht aktiviert werden kann;
- (b) einen Nukleinsäurevektor, in den eine DNA-Sequenz exprimierbar eingefügt ist, die einen Membranrezeptor, wie vorstehend definiert, kodiert, wobei der Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors ein Polypeptid oder Protein, bei dem eine Ligandenbindungsfunktion eines Rezeptors vermutet wird, umfaßt oder daraus gebildet wird und das Effektorprotein oder -polypeptid, dessen Bindung an eine Membrankomponente von der Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors abhängig ist, in der Lage ist, den inaktiven Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg in den unter (a) genannten Zellen zu aktivieren;
- (c) einen Nukleinsäurevektor, in den eine DNA-Sequenz exprimierbar eingefügt ist, die das Effektorprotein oder -polypeptid, das im Falle einer Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors an eine Komponente der Membran, gegebenenfalls über weitere Proteine oder Polypeptide, binden kann, kodiert;
- (d) einen Nukleinsäurevektor, in den eine DNA-Sequenz exprimierbar eingefügt ist, die mindestens ein Adaptorprotein, über welches das Effektorprotein oder -polypeptid bei Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors an eine Komponente der Membran binden kann, kodiert.

Ein alternativer Kit zur Verwendung in dem genannten Assay ermöglicht bei spezieller Auswahl der nachfolgend angegebenen Komponenten u.a. das gezielte Ausstatten einer Assayzelle mit einem Membranrezeptor, der ein vom Verwender des Kits gewünschtes, auf seine Ligandenbindungsfunktion zu untersuchendes Polypeptid oder Protein als Ligandenbindungsabschnitt umfaßt. Ein solcher Kit umfaßt mindestens zwei der folgenden Komponenten:

- (a) Zellen, in denen zumindest unter bestimmten Bedingungen ein Ras- oder Ras-ähnlicher Signalweg nicht aktiviert werden kann;
- (b) einen Nukleinsäurevektor, der in geeigneter Anordnung umfaßt:

- einen DNA-Abschnitt, der ein Membranlokalisierungssignal eines Membranrezeptors, wie vorstehend in Zusammenhang mit dem Membranrezeptor definiert, kodiert;
- einen DNA-Abschnitt, der einen Mediatorabschnitt eines Membranrezeptors, wie vorstehend in Zusammenhang mit dem Membranrezeptor definiert, kodiert; und

- eine geeignet angeordnete Insertionsstelle zur funktionalen Insertion einer DNA-Sequenz, die ein Polypeptid oder Protein, bei dem eine Ligandenbindungsfunktion eines Rezeptors vermutet wird, kodiert,

wobei nach Insertion einer DNA-Sequenz für den Ligandenbindungsabschnitt der Nukleinsäurevektor ein vollständiges exprimierbares Gen für einen Membranrezeptor umfaßt, wobei das Effektorprotein oder -polypeptid, dessen Bindung an eine Membrankomponente von der Bindung eines Liganden an den aus dem Polypeptid oder Protein, bei dem eine Ligandenbindungsfunktion eines Rezeptors vermutet wird, gebildeten Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors abhängig ist, in der Lage ist, den inaktiven Ras- oder Ras-ähnlichen Signalweg in den unter (a) genannten Zellen zu aktivieren;

- (c) einen Nukleinsäurevektor, in den eine DNA-Sequenz exprimierbar eingefügt ist, die das Effektorprotein oder -polypeptid, das im Falle einer Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors an eine Komponente der Membran, gegebenenfalls über weitere Proteine oder Polypeptide, binden kann, kodiert;

(d) einen Nukleinsäurevektor, in den eine DNA-Sequenz exprimierbar eingefügt ist, die mindestens ein Adaptorprotein, über welches das Effektorprotein oder -polypeptid bei Bindung eines Liganden an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors an eine Komponente der Membran binden kann, kodiert.

Auch für die beiden letztgenannten Kits gilt, daß in einer speziellen Ausführungsform die Komponente (c) des Kits einen Nukleinsäurevektor umfaßt, dessen DNA-Sequenz ein Effektorprotein oder -polypeptid in Form eines Fusionsproteins aus einem Effektorabschnitt und einem Adaptorprotein oder -polypeptid, das die Bindung an eine Komponente der Membran, gegebenenfalls über weitere Proteine oder Polypeptide, ermöglicht, kodiert.

Bei einem vorgesehenen Nachweis einer Reporterogenaktivität enthalten in einer Ausführungsform die Zellen in den vorstehend genannten Kits zusätzlich ein Konstrukt, umfassend eine Bindungsstelle für einen Transkriptionsfaktor, dessen Aktivierung infolge einer Aktivierung des speziellen ras-Signalwegs, dessen Aktivierung durch den Assay nachgewiesen werden soll, erfolgt, einen Minimalpromotor und das Reportergen, wie vorstehend erläutert, oder es kann alternativ getrennt von den Zellen ein Transformations- oder Transfektionsvektor mit dem Transkriptionsfaktorbindungsstelle-Minimalpromotor-Reportergen-Konstrukt oder mit einem andersartigen Konstrukt, umfassend die Transkriptionsfaktorbindungsstelle und den Minimalpromotor und darüber hinaus eine geeignet angeordnete Insertionsstelle für ein frei wählbares Reportergen, vorgesehen werden.

Darüber hinaus können sämtliche Kits dieser Erfindung in möglichen Ausführungsformen u.a. zusätzlich noch mindestens eine der folgenden Komponenten umfassen:

(b) gegebenenfalls einen Nukleinsäurevektor, in den eine DNA-Sequenz exprimierbar eingefügt ist, die mindestens ein Vermittlerprotein kodiert, welches mit dem Mediatorabschnitt des Membranrezeptor räumlich nicht unmittelbar assoziiert sein muß, jedoch im Falle einer Ligandenbindung an den Ligandenbindungsabschnitt des Membranrezeptors von diesem Mediatorabschnitt aktiviert oder modifiziert wird und aufgrunddessen ein sekundäres Ereignis an einer weiteren Komponente der Zellmembran vermit-



telt, infolgedessen sich das Effektorprotein oder -polypeptid spezifisch an diese Komponente der Zellmembran, die mit dem Mediatorabschnitt des Membranrezeptors nicht assoziiert ist, bindet;

(f) gegebenenfalls Reagenzien zur Transformation oder Transfektion der Zellen mit Transformations- oder Transfektionsvektor(en),

(g) gegebenenfalls Reagenzien zur Detektion der phänotypischen Aktivierung des sich an ein Ras-Protein anschließenden Signaltransduktionsweges in diesen Zellen.

In einer bevorzugten Ausführungsform der Erfindung umfassen die erfindungsgemäßen Kits die Zellen immobilisiert auf einem festen Träger, wie vorstehend erläutert, insbesondere auf Biochips (vgl. Wolf et al. 1997 und 1998). Für Massenscreens und insbesondere High-Throughput-Verfahren zum Nachweisen und Messen von Membranrezeptor-Liganden-Interaktionen ist insbesondere die Immobilisierung der Zellen auf Biochips sowie in den individuellen Vertiefungen von Mikrotiterplatten geeignet, so daß auf einer solchen Platte eine Vielzahl von separaten Assayverfahren durchgeführt werden können. Es ist hierbei auch möglich, unterschiedliche erfindungsgemäße Zellen, d.h. insbesondere Zellen mit unterschiedlichem Ligandenbindungsabschnitt, in Vertiefungen in jeweils bestimmten Abschnitten auf ein und derselben Mikrotiterplatte vorzusehen.

Befinden sich die Zellen in dem Kit immobilisiert an einem festen Träger, so kann es insbesondere bei Nachweis einer Reporterogenaktivität oder -transkription oder eines Reporterproteins erforderlich oder hilfreich sein, die Zellen vor der Nachweisreaktion zu solubilisieren, d.h. sie von dem Träger abzulösen und ggf. auch aufzubrechen. Für diesen Fall können die unter g) genannten Reagenzien zur Detektion der phänotypischen Aktivierung des Ras- oder Ras-ähnlichen Signaltransduktionsweges auch geeignete Solubilisierungsreagenzien, die insbesondere ein oder mehrere grenzflächenaktive Mittel oder Tenside enthalten, umfassen.

In einem gegenwärtig bevorzugt verwendeten experimentellen System der Erfindung wird als Zellsystem, welches in einem ras-

oder ras-ähnlichen Signaltransduktionsweg inaktiv ist, der Hefestamm cdc25-2 verwendet. Wie erläutert, ist in diesen Zellen das Ras-Protein bei einer restriktiven Temperatur von 33-37°C, typischerweise 36°C, infolge der Abwesenheit eines funktionellen Guaninnukleotid-Austauschfaktors (GEF; "guanyl nucleotide exchange factor") nicht funktionell (Broder et al., 1998). Eine Aktivierung des in diesem System bei restriktiven Temperaturen nicht funktionellen ras-Signaltransduktionswegs, die unter diesen Bedingungen nur über die, wie beschrieben, über verschiedene Maßnahmen bewirkbare Translokation eines Effektorproteins oder -polypeptids, das diesen ras-Signaltransduktionsweg zu aktivieren vermag, an die Zellmembran veranlaßt werden kann, kann dadurch detektiert werden, daß die Hefezellen unabhängig von der Anwesenheit eines funktionellen GEF-Proteins bei restriktiven Temperaturen (33-37°C, typischerweise 36°C) wachsen können. Wie erläutert erfordert die Translokation des Effektorproteins oder -polypeptids, daß ein passender Ligand für den speziell in der Zelle vorgesehenen Membranrezeptor vorhanden ist.

In diesem System wird insbesondere ein Fusionsprotein eingesetzt, das als Effektorabschnitt ein mutiertes humanes Ras-Protein (Ha-Ras, L61) umfaßt, dem die Farnesylierungssequenz, welche für eine Membranlokalisierung des Proteins sorgt, fehlt.

Die nachfolgend exemplarisch angegebenen Beispiele sollen die Erfindung weiter veranschaulichen.

1. "Epidermal growth factor" (EGF)-Interaktion mit dem EGF-Rezeptor (Figur 3)

#### Material und Methoden

Folgende zwei Vektoren dienen zur Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* cdc25-2 Zellen:

1. Ein Expressionsvektor für die konstitutive Expression des humanen EGF-Rezeptorproteins.

2. Ein induzierbarer Expressionsvektor mit einem Galaktose-induzierbaren Promotor (Gal 1) für die Expression des Adaptor-Effektor-Fusionsproteins, bestehend aus dem humanen konstitutiv aktiven ras-Proteinteil (Ha-ras, L61), dem die sogenannte CAAX-Box (das Farnesylierungssignal zur Membranlokalisierung) fehlt, (=Effektorabschnitt) und dem murinen Grb2-Proteinteil (=Adaptorabschnitt).

#### Hefewachstum und -manipulation

Es wurden konventionelle Hefe-Transformations- und -manipulationsprotokolle (siehe z.B. Hill et al. (1991), NAR 19, 5791) verwendet. Die Zellen wurden entweder auf einem Glucoseminimalmedium, welches die erforderlichen Aminosäuren und Nukleotide (20 mg/l Histidin, 100 mg/l Leucin, 20 mg/l Tryptophan, 20 mg/l Uracil, 10 mg/l Adeninsulfat), 2% Glucose, 0,5%  $\text{NH}_4\text{SO}_4$ , 0,17% Hefeextrakt und 4% Agar enthält, oder auf Galaktosemedium (1,7 g/l Yeast Nitrogen ohne Aminosäuren, 5 g/l Ammoniumsulfat, 30 g/l Galaktose (> 99%) 20 g/l D-Raffinose, 20 g/l Glycerin (100%), 30 g/l Bacto-Agar) ausplattiert.

Replika-Plattierungen werden mit einem Samt-Replikaplattierer durchgeführt. Die Zellen werden nach der Transformation mit den oben beschriebenen zwei Expressionsvektoren auf Glucoseplatten ausplattiert und bei 25°C (nicht-restriktive Temperatur) für 3-4 Tage inkubiert. Anschließend werden verschiedene Testmedien (mit und ohne EGF, bzw. mit synthetischen Proteinfragmenten mit Ligandenaktivität - siehe Komoriya et al., 1984) mit jeweils drei unabhängigen Klonen angeimpft und bei 37°C für 2-3 Tage inkubiert und anschließend das Wachstum der Hefen in den verschiedenen Flüssigmedien detektiert. Hefen, die in Galaktosemedium bei 37°C nur in Anwesenheit von EGF (zellwandlose Hefeghost-Zellkultur) oder nur in Anwesenheit von [S-Acetamidomethyl Cys <sup>20, 31</sup>]-EGF-(20-31), einem aktiven EGF-Fragment, wachsen, zeigen funktionsfähige Liganden-Rezeptor-Interaktion an.

2. Angiotensin-Interaktion mit dem Angiotensinrezeptor  
(Figur 4)

## Material und Methoden

Folgende Vektoren dienen zur Transformation von *Saccharomyces cerevisiae* cdc 25-2 Zellen:

1. Ein Expressionsvektor für die konstitutive Expression des AT1A-Angiotensin-Rezeptors der Ratte (Condon et al., 1997)
2. Ein oder mehrere Expressionsvektoren für die konstitutive Expression der drei G-Proteine  $G\alpha_{13}$ ,  $G\beta_1$  und  $G\gamma_3$  der Ratte (Macrez-Leprêtre et al., 1997).
3. Ein induzierbarer Expressionsvektor (Selektionsmarker Ura) mit einem Galaktose-induzierbaren Promotor (Gall) für die Expression des Adaptor-Effektor-Fusionsproteins, bestehend aus der Phosphatidylcholin-Phospholipase C minus der Domäne mit dem Membranlokalisierungssignal (=Adaptorabschnitt) aus vaskulären Myozyten der Ratte (Macrez-Leprêtre et al., 1996) und dem humanen konstitutiv aktiven ras-Proteinanteil (Ha-ras L61), dem die sogenannte CAAX-Box (das Farnesylierungssignal zur Membranlokalisierung) fehlt (=Effektorabschnitt).

## Hefewachstum und Manipulation

Hier gilt entsprechendes wie in Beispiel 1. Die für die Angiotensinrezeptorversuche verwendeten Testmedien wurden plus/minus Angiotensin bzw. plus/minus L-162,313, einem funktionellen, nicht-proteinartigen Ligand des Angiotensinrezeptors (Perlmann et al., 1995), eingesetzt. Hefen, die nach 2 bis 3 Tagen bei 37°C in Galactosemedium nur in Anwesenheit von Angiotensin (zellwandlose Hefe-ghost-Zellkultur) oder nur in Anwesenheit des Nichtproteinliganden L-162,313 wachsen, zeigen funktionsfähige Liganden-Rezeptor-Interaktion an.

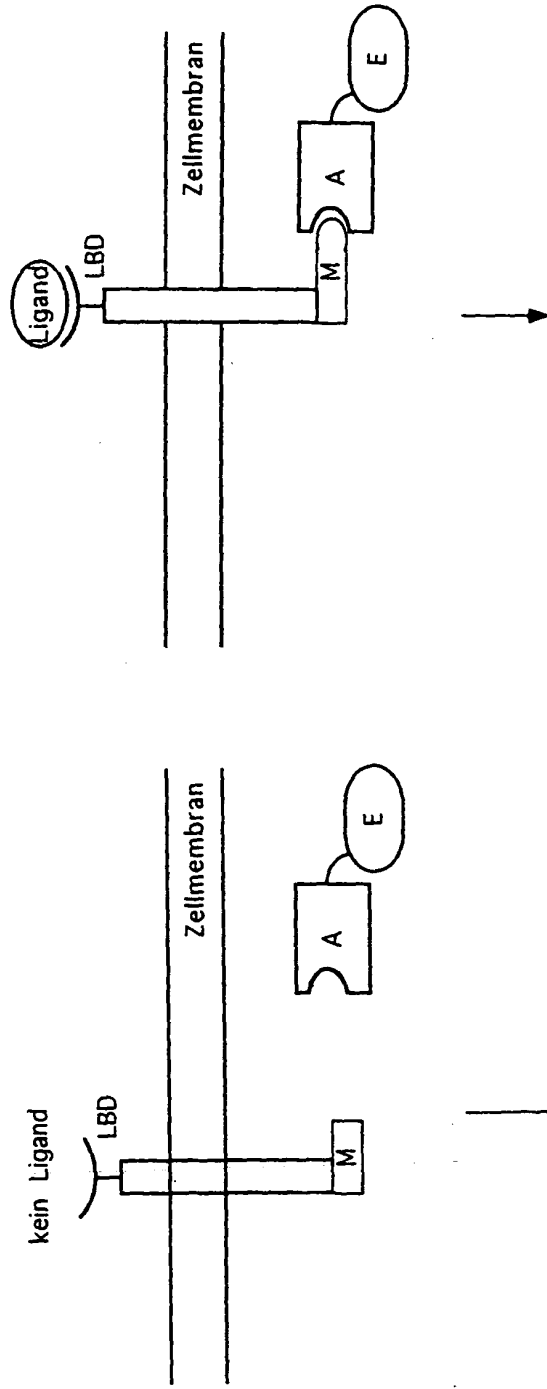
## Literatur

- Broder, Y.C., Katz, S. und Aronheim, A. (1998). Curr. Biol. 8, 1121-1124
- Conchon, S., Barrault, M.-B., Miserey, S., Corvol, P. und

- Clauser, E. (1997). J. Biol. Chem. 272, 25566-25572
- Current Protocols in Molecular Biology, 1991
  - Dohlman, H. G., Thomer, J. , Caron, M.G. Leifkowitz, R.J. (1991). Ann. Rev. Biochem. 60, 653-688
  - Komoriya, A., Hortsch, M., Meyers, C., Smith, M., Kanety, H. und Schlessinger, J. (1984) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81, 1351-1355
  - Leurs, R., Smit, M.J., Alewijnse, A.E. und Timmermann, H. (1998). TIBS 23, 418-422
  - Macrez-Leprêtre, N., Morel, J.-L. und Mironneau, J. (1996) J. Pharmacol. Exp. Ther. 278, 468-475
  - Macrez-Leprêtre, N., Kalkbrenner, F., Morel, J.-L., Schultz, G. und Mironneau, J. (1997). J. Biol. Chem. 272, 10095-10102
  - Nishida, E. und Gotoh, Y (1993). Trends Biochem. Sci 18, 128-130
  - Perlmann, S., Shambye, H.T., Rivero, R.A., Greenlee, W.J., Hjorth, S.A. und Schwartz, T.W. (1995). J. Biol. Chem. 270, 1493-1496
  - Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T. (1989), Molecular Cloning. A Laboratory Handbook, Cold Spring Harbor Laboratory, New York
  - Schlessinger, J. und Ulrich, A. (1992). Neuron 9, 383-391
  - Schlessinger, J. (1993). Trends Biochem. Sciences 18, 273-275
  - Stahl, N. und Yancopoulos, G.D. (1993) Cell 74, 587-590
  - Wolf, B., Kraus, M., Baumann, W., Brischwein, M., Ehret, R., Henning, T., Lehmann, M. und Schwinde, A., (1997). BioTec 6/97, 26-29
  - ibid (1998). BioTec 1/98, 24-27

# Schematische Darstellung der Detektion einer Liganden-Membranrezeptor-Interaktion

Fig. 1



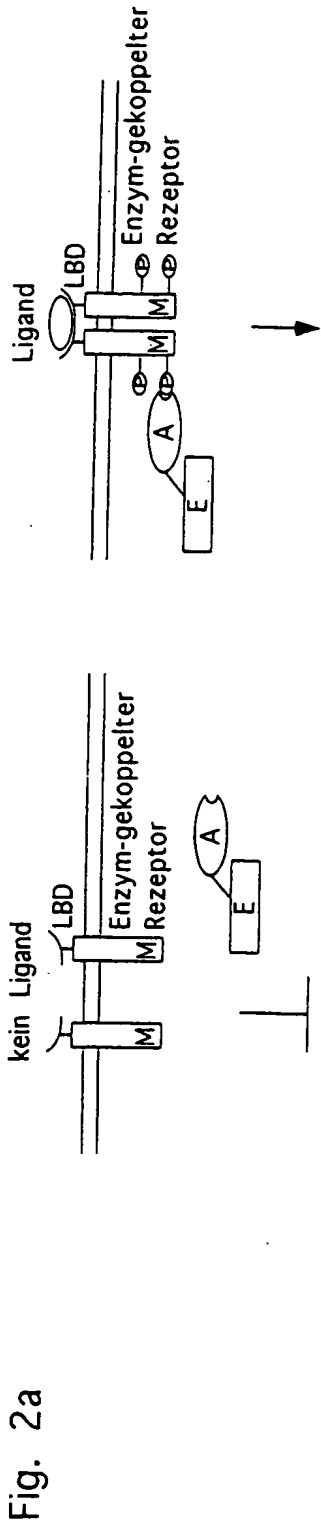
in Abwesenheit des Liganden erfolgt  
keine phänotypische Änderung der Zelle

in Anwesenheit des Liganden erfolgt  
eine phänotypische Änderung der Zelle

LBD : Ligandenbindungsdomäne  
M : Mediator

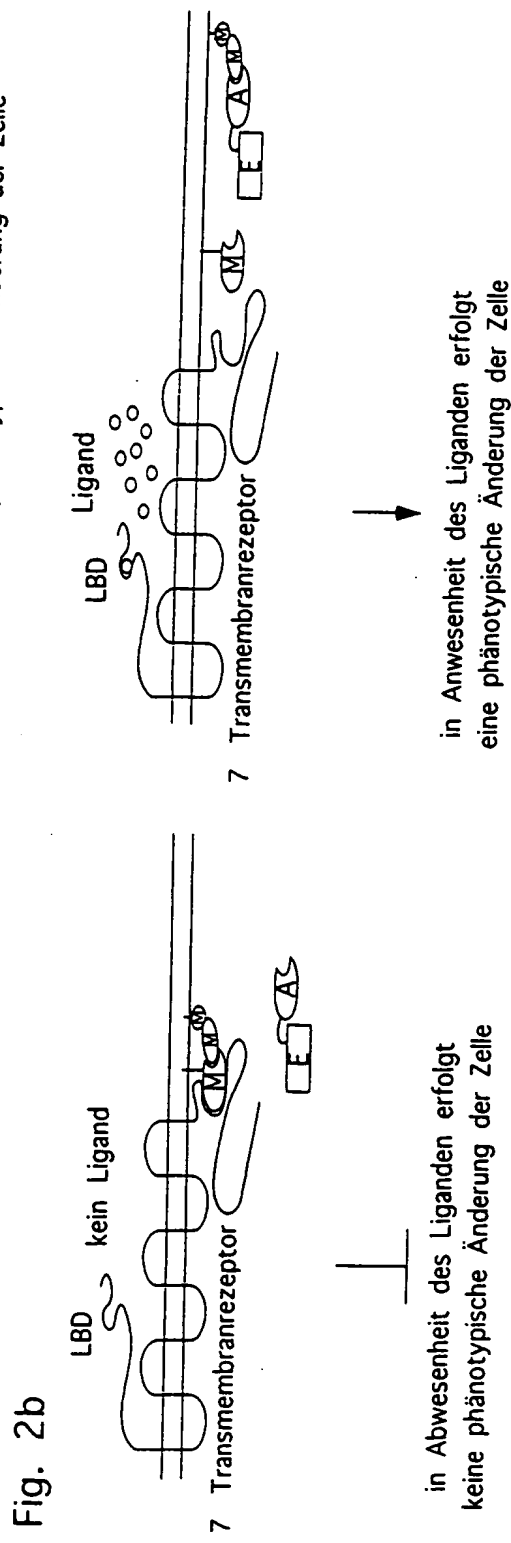
A : Adaptor  
E : Effektor

# Schematische Darstellung einer Liganden-Membranrezeptor-Interaktion eines Enzym-gekoppelten bzw. eines G-Protein-gekoppelten Rezeptors



in Abwesenheit des Liganden erfolgt keine phänotypische Änderung der Zelle

in Anwesenheit des Liganden erfolgt eine phänotypische Änderung der Zelle



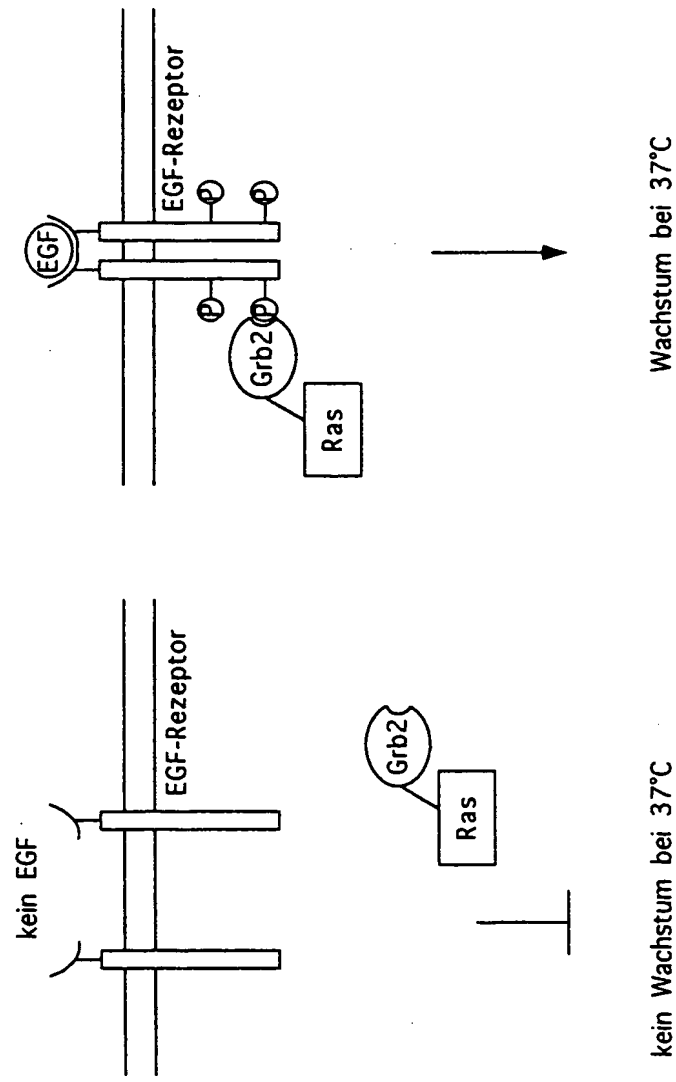
in Abwesenheit des Liganden erfolgt keine phänotypische Änderung der Zelle

in Anwesenheit des Liganden erfolgt eine phänotypische Änderung der Zelle

LBD : Ligandenbindungsdomäne  
M : Mediator  
A : Adaptor  
E : Effektor

# Schematische Darstellung der Detektion der Interaktion des EGF mit dem EGF-Rezeptor

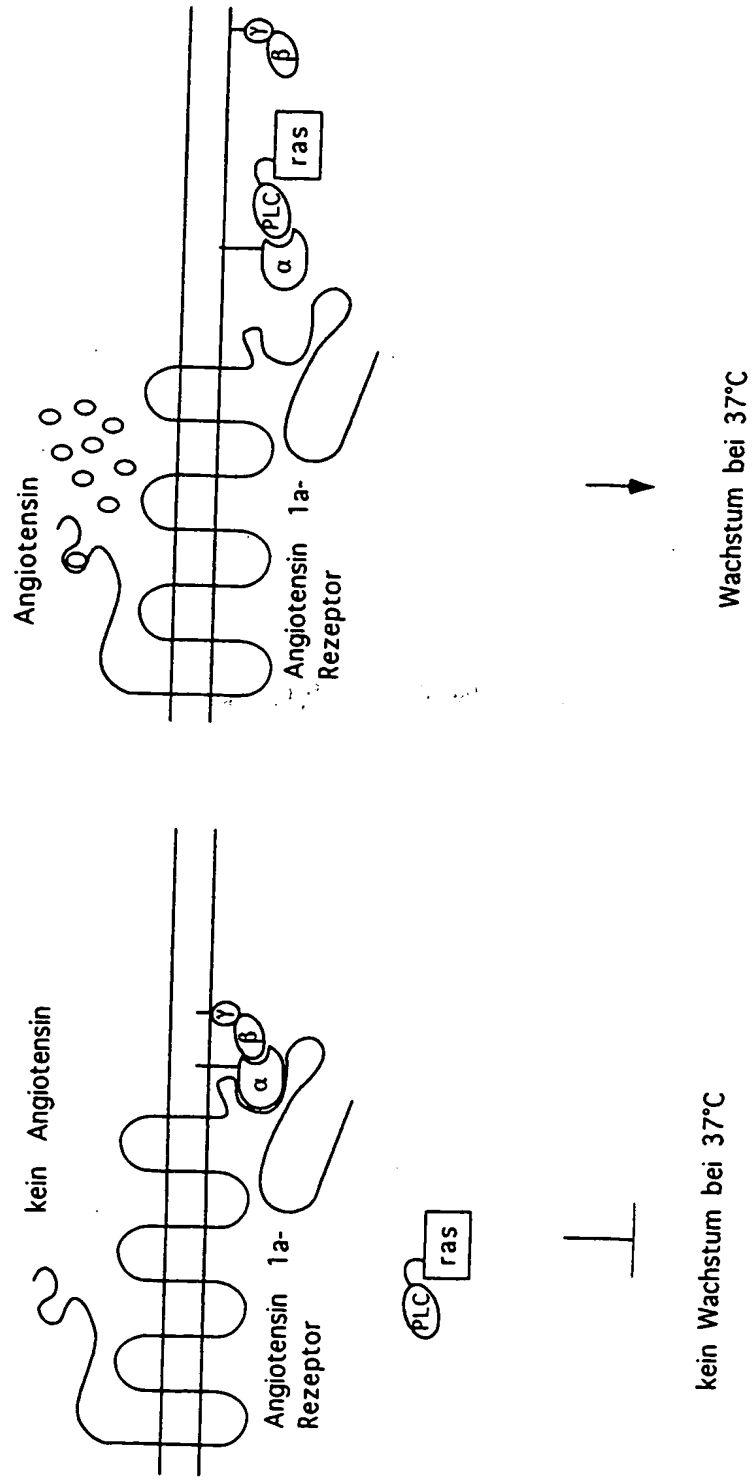
Fig. 3





# Schematische Darstellung der Detektion der Interaktion zwischen Angiotensin und dem Angiotensin 1a-Rezeptor

Fig. 4



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**